

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



Polimorfismos genéticos do VEGF, RAGE, PON1 e PON2 na retinopatia diabética em indivíduos com diabetes tipo 2

Fernanda Maria Gomes Azancoth

Curso de Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar

Lisboa, 2012

Esta dissertação foi aprovada pelo Concelho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de (oportunamente indicada).

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



Polimorfismos genéticos do VEGF, RAGE, PON1 e PON2 na retinopatia diabética em indivíduos com diabetes tipo 2

Fernanda Maria Gomes Azancoth

Orientador: Professora Doutora Constança Coelho, Laboratório de Genética, Centro de Cardiologia, Faculdade de Medicina de Lisboa,

Todas as afirmações contidas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do candidato, não cabendo à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa qualquer responsabilidade.

Curso de Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar

Lisboa, 2012

Ao meu pai...

...até sempre.

Publicações / Apresentações realizadas durante este trabalho

Artigo de Revisão:

Azancoth F, Pêgo P, Bicho M, Coelho C. **Factores genéticos de susceptibilidade para a retinopatia diabética em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.** Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. 2012 jan-jun; 7(01): 68-83.

Comunicação oral:

“RAGE T-374A polymorphism as a protective genetic factor for diabetic retinopathy and macular edema”. XXXVII Jornadas Portuguesas de Genética, 28-30 Maio, 2012, Lisboa.

“Abstract” em conferências internacionais:

“RAGE T-374A polymorphism as a protective genetic factor for diabetic retinopathy and macular edema”. Pêgo P, Azancoth F, Silva F, Pires G, Bicho M, Coelho C. American Academy of Ophthalmology Annual Meeting, 9-14 Novembro, 2012, Chicago.

Índice

Índice.....	1
Agradecimentos.....	10
Glossário.....	12
Lista de Figuras.....	16
Lista de tabelas.....	18
Lista de Gráficos.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22

I-INTRODUÇÃO.....	23
1.1.Factores de risco para a retinopatia diabética.....	26
2.Patofisiologia da retinopatia diabética.....	27
2.1.Via do poliol.....	29
2.2.Activação da proteína cinase C.....	31
2.3. Formação e acumulação de produtos finais de glicação avançada (AGE).....	32
3.Susceptibilidade genética para a retinopatia diabética.....	34
4.Genes candidatos para a retinopatia diabética.....	35
4.1. Vascular endothelial growth factor (VEGF).....	35
4.2.Receptor for advanced glycation end products (RAGE).....	38
4.3. Genes da Paraoxonase sérica humana (PON1 e PON2).....	39
5. Actividade enzimática da PON1.....	41
6. Terapêutica.....	41
II.OBJETIVO.....	43
III.METODOLOGIA.....	44
1. Amostra populacional.....	44
2. Colheita de sangue e soro.....	44

3. Parâmetros Genéticos	45
3.1. Extração e quantificação de DNA.....	45
3.2. Identificação dos Polimorfismos.....	45
3.2.1. Método de PCR (Polimerase Chain Reaction).....	45
3.2.2. Método de PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism).....	47
3.2.3. Polimorfismo do VEGF -634C/G.....	49
3.3. Determinação de parâmetros bioquímicos.....	51
3.3.1. Determinação da actividade enzimática da PON1.....	51
3.3.1.1. Actividade enzimática da PON1	52
3.3.1.2. Optimização das condições do ensaio e armazenamento dos soros.....	53
3.3.1.2.1. Determinação do intervalo tempo	54
3.3.1.2.2. Determinação da concentração do substrato (paraoxone).....	54
3.3.1.2.3. Determinação do volume de soro a utilizar.....	56
3.3.1.2.4. Determinação das condições de armazenamento do soro a utilizar	57
3.4. Análises laboratoriais.....	59
3.5. Parâmetros de segurança.....	59
3.6. Análise estatística.....	60
IV-RESULTADOS.....	61
1. Dados demográfico.....	61
2. Caracterização Clínica dos diabéticos do Hospital Fernando da Fonseca (HFF).....	61
2.1. Análise da amostra populacional do Hospital Fernando da Fonseca, estratificados pela presença ou ausência de Retinopatia Diabética.....	62

2.2. Análise da amostra populacional do Hospital Fernando da Fonseca, estratificados pela presença ou ausência de Edema Macular.....	64
2.3. Análise de alguns factores de risco para a ocorrência das complicações microvasculares da DM2.....	66
3. Influência dos polimorfismos genéticos do VEGF, RAGE, PON1 e PON2 na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2 e sua evolução para Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético.....	68
3.1. Influência do polimorfismo genético VEGF -634G/C na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético.....	69
3.2. Influência do polimorfismo genético RAGE -374A/T na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético.....	70
3.3. Influência do polimorfismo genético PON1 Gln192Arg na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético.....	73
3.4. Influência do polimorfismo genético PON2 Cys310Ser na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético.....	75
3.5. Influência da actividade enzimática da PON1 na Diabetes Mellitus tipo 2 e suas complicações microvasculares.....	77
V-DISCUSSÃO.....	79
1. Influência do polimorfismo genético VEGF-634G/C na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético.....	82

2. Influência do polimorfismo genético RAGE-374A/T na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético.....	84
3. Influência dos polimorfismos genéticos PON1 Gln192Arg e PON2 Cys310Ser na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético.....	86
4. Influência do polimorfismo genético PON1 Gln192Arg na actividade enzimática sérica da paraoxonase.....	87
VI.CONCLUSÃO.....	90
VII.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
VIII.REFERÊNCIAS.....	93
IX.ANEXOS.....	115

Agradecimentos

Embora existem pessoas, que um simples obrigado não é suficiente para descrever a quão agradecida sou, por tudo aquilo que contribuíram para a pessoa que hoje sou. Ainda assim é-me dado esta pagina na qual vou tentar, pelo menos dizer quem são,

À minha orientadora Professora Doutora Constança Coelho, por me ter aceitado, ainda com todas as necessidades que apresentava e que com empenho, boa vontade e paciência dignou-se apresentar-me e transmitir-me aquilo que sabe deste mundo da que é a ciência. Agradeço profundamente o tempo dispensado, as discussões, o apoio, o incentivo e a amizade.

Ao Professor Doutor Manuel Bicho, por ter-me aberto as portas do Laboratório de Genética e ter permitido que aí desenvolvesse esse trabalho. Muito mais ainda pela orientação, pelo aprendizado, pela disponibilidade e cordialidade, meu muito obrigado.

Ao Dr. Peter Pego, oftalmologista, que cuidou da integração da amostra de pacientes do estudo, agradeço as opiniões e os esclarecimentos.

Ao Laboratório de Genética no seu todo, com todas as pessoas que me colheram e permitiram a partilha do espaço. Neste, um especial obrigada a duas grandes pessoas, que de uma forma especial tocaram a minha vida (e nela vão permanecer) e contribuíram em grande para que esse trabalho chegasse ao fim. D. Manuela obrigada pela amizade, carinho, incentivo e atenção que se estenderam para além dos limites geográficos do Laboratório de Genética. “A ti Irina nunca terei palavras suficientes, por mais que tentasse nunca conseguiria exprimir nelas o tamanho do meu agradecimento.” ... O meu mais sincero e profundo obrigado.

Por fim, mas não os menos importantes, àquelas pessoas que sempre fizeram parte da minha vida e que nela contribuíram por aquilo que sou:

À minha mãe Maria e à minha mãe Lurdes pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos:

Bia, Manuel e João, meus alicerces, sem os quais não teria alcançado mais este objectivo. Assim como à Aurora, o Fernando, a Nela, a Ani e a Deilene, pela força pelo amor e pela amizade.

À minha avó, exemplo de mulher, exemplo de vida.

Aos meus sobrinhos, meus amores.

Ao Rodolfo e à Sleidy, pela amizade e companhia.

À Ângela, minha amiga e cúmplice, que sempre esteve presente nos melhores e piores momentos que em Portugal tenho vivido.

Obrigada ao meu Amigo lá de “cima”.

Glossário

5'UTR – *5' untranslated region*

3'UTR – *3' untranslated region*

A

ACCORD – *Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*

AGE ou AGEs – *Advanced glycation and products*

Arg - Arginina

AV – Acuidade visual

C

Col-HDL – colesterol HDL

Col-Total – Colesterol total

Cys – *Cysteine*

D

DCV – Doenças cardiovasculares

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – *Desoxiribonucleic acid*

E

EDTA – *Ethylene-diamine-tetra-acetate*

EMD – Edema macular diabético

ETDRS – *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*

G

GSH – Glutathione reduzido

Gln – Glicina

H

HbA1c – *Glycated hemoglobin* (hemoglobina glicada)

HDL – *High Density Lipoproteins*

HTA – hipertensão arterial

HIF – *Hypoxia inducible factor*

I

IMC – Índice de massa corporal

IRMA – *Intraretinal microvascular abnormalities*

IVT – *Intravitreal triamcinolone*

L

LDL – *Low Density Lipoproteins*

M

MAVC – Melhor acuidade visual

MESA – *Multy Ethnic Study Atherosclerosis*

N

NAD⁺ - *Nicotinamide adenine dinucleotide oxidado*

NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduzido*

O

OD – olho direito

OE – olho esquerdo

OCT – Tomografia ocular computadorizada

P

PKC – *Proteine kinase C*

PIO – Pressão intraocular

PON1 – Paraoxonase 1

PON2 – Paraoxonase 2

P1 – primer 1

P2 – primer 2

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

R

RAGE – *Receptor for advanced glycation and products*

RD – Retinopatia diabética

RDNP – Retinopatia diabética não proliferativa

RDP – Retinopatia diabética proliferativa

RT-PCR – *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*

S

Ser – Arginina

U

UKPDS – *United Kingdom Prospective Diabetes Study*

V

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

Lista de figuras

Figura 1 – As quatro possíveis vias pelas quais a hiperglicémia poderá conduzir ao aparecimento das comorbilidades na DM: o aumento do fluxo pela via do poliol, a activação das isoformas da proteína cinase C (PKC), o aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE) e a sobrecarga oxidativa.....	29
Figura 2 – Resumo das reacções decorrentes da via do poliol, que culminam em danos a nível celular e que podem contribuir para o aparecimento e desenvolvimento da RD. Abreviaturas: AR – aldose reductase; SDH – sorbitol desidrogenase; GSH – glutationo; AGEs – produtos finais de glicação avançada; ROS – espécies reactivas de oxigénio.....	31
Figura 3 – Formação dos AGEs na presença de hiperglicémia. O processo inicia-se com a conversão reversível das bases de Schiff, os re-arranjos dos produtos de Amadori e uma série de reacções complexas que culminam na formação de AGEs. A interacção entre o AGE e o RAGE conduz à geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS), com o subsequente processo inflamatório, activação de macrófagos e plaquetas, e formação de trombos, que em conjunto desempenham um importante papel no desenvolvimento e progressão das complicações diabéticas.....	33
Figura 4: Ilustração do método de PCR.....	46

Figura 5: Ilustração da localização dos <i>primers</i> a vermelho, da sequência identificada pelo enzima de restrição, a azul, e do local de hidrólise.....	50
Figura 6: Fotografia do gel de agarose onde se identificam os diferentes genótipos do polimorfismo VEGF -634C/G, com os respectivos pares de base.....	51
Figura 7: Esquema da reacção catalisada pelo enzima paraoxonease. Adaptado de Furlong et al. ¹¹⁴	52
Figura 8: Processo de determinação das condições de armazenamento das amostras de soro para a determinação da actividade enzimática da PON1.....	58

Lista de tabelas

Tabela 1: Descrição das condições de PCR para cada um dos polimorfismos avaliados neste estudo.....	48
Tabela 2: Descrição das condições de hidrólise para cada um dos polimorfismos avaliados neste estudo.....	49
Tabela 3: Características dos pacientes com diabetes tipo 2 (DM2).....	62
Tabela 4: Características dos pacientes com diabetes tipo 2 (DM2), estratificados pela presença ou ausência de retinopatia diabética (RD).....	63
Tabela 5: Características dos pacientes com diabetes tipo 2 (DM2), com e sem retinopatia diabética (RD), estratificados pela presença ou ausência de edema macular (EMD).....	65
Tabela 6: Distribuição de genótipos e alelos do polimorfismo do VEGF -634G/C, em controles e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD.....	69
Tabela 7: Distribuição de genótipos do polimorfismo do VEGF -634G/C, em controles e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD, após agrupamento.....	70
Tabela 8: Distribuição de genótipos e alelos do polimorfismo do RAGE -374A/T, em controles e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD.....	71
Tabela 9: Distribuição de genótipos do polimorfismo do RAGE -374A/T, em controles e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD, após agrupamento.....	72
Tabela 10: Risco relativo para a associação entre o alelo A do polimorfismo do RAGE -374A/T, em indivíduos com ou sem RD ou com e sem EMD.....	72
Tabela 11: Distribuição de genótipos e alelos do polimorfismo do PON1 Gln192Arg, em controles	

e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD.....	73
Tabela 12: Distribuição de genótipos do polimorfismo do PON1 Gln192Arg, em controlos e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD, após agrupamento.....	74
Tabela 13: Risco relativo para a associação entre o alelo Q do polimorfismo PON1 Gln192Arg, em indivíduos com DM2 comparados com controlos.....	74
Tabela 14: Distribuição de genótipos do polimorfismo do PON2 Cys310Ser, em controlos e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD.....	75
Tabela 15: Distribuição de genótipos do polimorfismo do PON2 Cys310Ser, em controlos e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD, após agrupamento.....	76
Tabela 16: Risco relativo para a associação entre o alelo S do polimorfismo PON2 Cys310Ser, em indivíduos com DM2 comparados com controlos.....	76

Lista de gráficos

Gráfico I: Representação da curva hiperbólica dada pela actividade enzimática da PON1 em função da concentração de paraoxone.....	55
Gráfico II: Representação da Curva de Michaelis-Menten obtida para a actividade enzimática da PON1 em função da quantidade de soro.....	56
Gráfico III: A ocorrência da RD e do EMD na população de diabéticos estudados. Valores expressos em percentagem. $p < 0,001$	64
Gráfico IV: Factores de risco para o desenvolvimento de comorbilidades da DM2 nos indivíduos com RD (valores expressos em percentagem). * $p < 0,05$	66
Gráfico V: Factores de risco para o desenvolvimento de comorbilidades na DM2 nos indivíduos com EMD (valores expressos em percentagem). $p > 0,05$	67
Gráfico VI: Actividade enzimática da PON1 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1 <i>Gln192Arg</i> em indivíduos diabéticos tipo 2 (valores expressos em média \pm SD). $p > 0,05$	77
Gráfico VII: Actividade enzimática da PON1 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) em indivíduos diabéticos tipo 2 com presença ou ausência de RD ou de EMD (valores expressos em média \pm SD). $p > 0,05$	78

RESUMO

A diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é responsável por uma elevada morbilidade e mortalidade em todo o Mundo, essencialmente devido às suas complicações, entre as quais a retinopatia diabética (RD), considerada uma das mais graves, e responsável por 4,8% dos casos de cegueira. Estudos sugerem uma componente genética como um dos principais factores para o desenvolvimento da RD. O gene do VEGF (*vascular endothelial growth factor*) é um dos mais estudados, por promover a angiogénese e a neovascularização. Outro importante gene candidato é o RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), e, mais recentemente, os genes da paraoxonase, PON1 e PON2. Objectivou-se avaliar a influência dos polimorfismos VEGF -634C/G, RAGE -374T/A, PON1Gln192Arg e PON2Cys310Ser no aparecimento e progressão da RD em indivíduos com DM2 e a sua influência no aparecimento da DM2. Analisaram-se 129 indivíduos, 86 com DM2 e 43 indivíduos saudáveis. Os polimorfismos foram avaliados em todos os indivíduos por PCR-FRLP. A caracterização clínica e a determinação da actividade enzimática da PON1 foram avaliadas em 47 diabéticos. Não se obtiveram diferenças para o polimorfismo do VEGF-634 G/C. O alelo A do polimorfismo RAGE -374A/T mostrou-se mais frequente em indivíduos sem RD ou EMD quando comparados com indivíduos com RD ou EMD. O alelo Q (Gln) e o alelo S (Ser) dos polimorfismos PON1Gln192Arg e PON2Cys310Ser, respectivamente, mostraram-se mais frequentes em indivíduos com DM2 quando comparados com indivíduos saudáveis. Não houve quaisquer diferenças relativamente à actividade enzimática da PON1, nem em relação ao polimorfismo da PON1 nem em relação à presença ou ausência de RD ou EMD. Conclui-se que o alelo A do polimorfismo RAGE -374A/T é factor protector para o aparecimento da RD e do EMD, enquanto os alelos Q e S dos polimorfismos PON1Gln192Arg e PON2Cys310Ser, respectivamente, são factores de risco para o aparecimento da DM2.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 2; retinopatia diabética; edema macular diabético; predisposição genética; VEGF; RAGE; PON1; PON2.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is responsible for high morbidity and mortality rates worldwide, mainly due to its complications, including diabetic retinopathy (DR), considered one of the most serious, and responsible for 4.8% of all cases of blindness. Studies suggest a genetic component as a major factor for the development of DR. The VEGF gene (vascular endothelial growth factor) is one of the most studied, due to its role in promoting angiogenesis and neo-vascularization. Another important candidate gene is RAGE (receptor for advanced glycation end products), and, more recently, paraoxonase genes, PON1 and PON2. Our aim was to evaluate the influence of the VEGF -634C/G, RAGE -374T/A, PON1 Gln192Arg and PON2 Cys310Ser polymorphisms on the onset and progression of DR in individuals with DM2, and its influence on the onset of DM2. We analyzed 129 subjects, 86 with DM2 and 43 healthy subjects. Polymorphisms were assessed in all subjects by PCR-RFLP. Clinical evaluation and PON1 enzymatic activity were evaluated in 47 diabetics. No differences were obtained for the VEGF -634G/C polymorphism. The RAGE -374A/T A allele was more frequent in individuals without DR or diabetic macular edema (DME) when compared with individuals with DR or DME. The Q allele (Gln) and the S allele (Ser) of PON1Gln192Arg and PON2Cys310Ser polymorphisms, respectively, were more frequent in individuals with DM2 compared with healthy subjects. There were no differences in the enzymatic activity of PON1, either concerning the PON1 polymorphism or the presence or absence of DR or DME. We conclude that the RAGE-374A/T A allele seems to protect patients with DM2 against the development of DR and DME, while the Q and S alleles of the PON1 Gln192Arg and PON2Cys310Ser polymorphisms, respectively, seem to be risk factors for the development of DM2

Keywords: *type 2 diabetes mellitus; diabetic retinopathy; diabetic macular edema; genetic predisposition; VEGF; RAGE; PON1; PON2.*

INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus (DM) é hoje considerada um dos mais graves problemas de saúde pública em todo o mundo¹, tendo já sido designada como a pandemia do século XXI. Para o ano de 2010 foi estimada a existência de 285 milhões de pessoas afetadas no mundo ocidental, comparadas com 170 milhões previstas em 2008² e mais de 135 milhões previstas em 2005³. De acordo com o estudo “*The Global Prevalence of Diabetes*”, a Índia, a China e os Estados Unidos são os países com maior prevalência de DM em todo mundo⁴. Em Portugal estima-se que a prevalência seja de 11,7% da população, sendo maior entre os homens (14,2%) e na faixa etária dos 60 aos 79 anos, existindo 905.035 portugueses entre os 20 e os 79 anos com DM⁵. Com base nas alterações demográficas, prevê-se que, em 2030, o número de pessoas com mais de 64 anos com DM aumentará em 82 milhões em países em desenvolvimento e em mais de 48 milhões em países desenvolvidos, sendo que o número total de pessoas afetadas deverá aumentar para 366 milhões. Prevê-se que os maiores aumentos relativos deverão ocorrer no Médio-Oriente, na África subsaariana, e na Índia⁶. De um modo geral, considera-se que 90% a 95% dos casos de DM em todo mundo seja de diabetes mellitus tipo 2 (DM2)^{2,7}.

A DM2 é uma das doenças que mais tem apresentado alterações epidemiológicas, tendo-se vindo a verificar, no decorrer dos últimos anos, não só um aumento da incidência, mas também uma diminuição da idade de diagnóstico⁸. É considerada uma doença crónica, multi-sistémica, que resulta de alterações no mecanismo de secreção e acção da insulina⁹, como consequência da resistência a essa hormona por parte dos tecidos periféricos e da sua secreção deficiente pelas células β do pâncreas². Reúne como principais factores de risco a obesidade⁹ e o excesso de peso, agravados pelo estilo de vida sedentário, o consumo calórico excessivo, o abuso do álcool e o uso do tabaco¹⁰, todos factores de risco modificáveis e, portanto, passíveis de prevenção¹¹. No entanto, as diferenças observadas

entre populações quanto ao grau de susceptibilidade para com a DM2 levam a supor que factores genéticos tenham um papel importante na manifestação desta patologia. Embora as bases genéticas da DM2 não estejam totalmente identificadas, a ocorrência familiar da DM2 tem sido verificada ao longo do tempo. Estudos em gémeos monozigóticos mostram que a DM2 apresenta uma concordância entre 50-92%, maior do que a concordância de 37% encontrada em gémeos dizigóticos^{12;13}. No entanto, e apesar de serem vários os genes candidatos como eventuais responsáveis para o desenvolvimento da DM2, os genes definitivos não estão identificados^{14;15}.

Por ser uma doença crónica, a DM2 está associada a um conjunto de complicações, responsáveis pelo grande aumento de mortalidade e morbilidade e pela considerável diminuição da qualidade de vida destes pacientes^{2;16}. As complicações macrovasculares e microvasculares da DM2, cujo principal responsável parece ser a hiperglicémia, torna estes pacientes mais susceptíveis para patologias cardiovasculares, como enfartes agudos do miocárdio e doenças arteriais periféricas^{2;17}.

As complicações microvasculares da DM2 apresentam-se, a longo prazo, como um grave problema de saúde pública. Comorbilidades como a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia diabéticas apresentam-se como as principais causas de cegueira, doença renal grave e amputação não traumática dos membros inferiores, respectivamente¹⁸. No que respeita à retinopatia diabética (RD), estima-se que ocorra após cerca de 15 anos de diagnóstico da DM2¹⁹. A RD é considerada a principal causa de cegueira no mundo ocidental, sendo responsável por 4,8% dos indivíduos cegos em todo o mundo^{20;21}. A ameaça à visão na RD pode ocorrer por dois mecanismos fisiopatológicos: por um lado, a diminuição da perfusão retiniana origina um aumento de neovascularização²², sendo a cegueira resultado da excessiva neovascularização com proliferação fibrovascular, aparecimento de hemorragias intraoculares e possível descolamento da retina²¹; por outro lado, a RD também pode originar lesão localizada na mácula (edema macular diabético – EMD) com perda importante da acuidade visual (AV) central.

Clinicamente, a RD pode ser classificada em diferentes graus de acordo com as alterações fundoscópicas detectadas. De acordo com a presença, número e localização de microaneurismas, hemorragias intraretinianas, anomalias venosas, anomalias microvasculares intraretinianas (IRMA), neovascularização e/ou hemorragia vítrea/pré-retiniana, a RD pode variar desde a ausência de retinopatia, a retinopatia não proliferativa (RDNP) e retinopatia proliferativa (RDP). Paralelamente, a RD também pode ser classificada de acordo com a presença de edema macular diabético (EMD). Actualmente é recomendada a utilização da Classificação Clínica Internacional (*Global Diabetic Retinopathy Project Group 2002*) baseada na classificação ETDRS (*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*) de forma a uniformizar a terminologia utilizada pela comunidade científica²³.

A duração da DM2, o controlo glicémico, a insulinoresistência e a hipertensão arterial têm sido apontados como os maiores factores de risco tanto para o aparecimento como para a progressão da RD^{20;24}.

A patogénese e os mecanismos exactos para o desenvolvimento da RD são complexos e ainda não totalmente conhecidos. Alguns dos factores que têm sido apontados como decisivos são a isquémia, as alterações na permeabilidade vascular e a libertação de factores de crescimento com consequente angiogénese e neovascularização, sendo que tanto a hiperglicémia como a insulinoresistência parecem desempenhar um papel importante nas complicações microvasculares, enquanto a hiperglicémia será também responsável pela activação de várias vias bioquímicas a ela secundárias. Estas vias podem, por sua vez, influenciar diversos factores vasoactivos que provavelmente são fundamentais no aparecimento de alterações funcionais e morfológicas na retina de pacientes com diabetes²⁵.

Esta introdução visa rever os estudos que investigaram a associação entre os principais factores de risco e a sua contribuição para o aparecimento e desenvolvimento da RD, dando especial relevância aos de carácter genético.

Factores de risco para a retinopatia diabética

O aumento da incidência e prevalência de quadros clínicos derivados de complicações microvasculares em indivíduos diabéticos é em grande parte influenciado pela hiperglicémia, característica desses pacientes, e vários são os estudos que apontam a hiperglicémia e os mecanismos a ela subsequentes como um dos principais ou mesmo o principal factor de risco para o aparecimento e desenvolvimento da RD^{2,25;26}. Também a duração da DM tem sido reportada como outro factor de risco *major* para o seu desencadeamento²⁷. Num grupo de indivíduos com DM2, diagnosticados há menos de cinco anos, 24% apresentam RD, e esta incidência aumenta para 40% nos que não apresentam controlo glicémico. Ao fim de 20 anos de diagnóstico, estas incidências aumentam para 53% e 84%, respectivamente²⁸. Com o agravamento do quadro clínico, a perda visual afecta 5-10% desses indivíduos²⁹. Neste sentido, a incidência da RD vê o seu maior aumento com o aumento do tempo de diagnóstico. A RDP, que é a forma mais grave da doença, desenvolve-se em 2% dos doentes com o diagnóstico da doença até os cinco anos, sendo a sua prevalência de aproximadamente 25% após 25 anos²⁸.

Pode-se afirmar que o controlo glicémico é o principal factor de risco modificável para a RD^{26;27;30}. Segundo o estudo UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*), que avaliou os factores de risco para a incidência e progressão da RD na DM2, existe uma forte associação entre a glicémia e as complicações vasculares. Os indivíduos com DM2 sujeitos a um controlo glicémico intensivo apresentaram uma diminuição de 35% no risco de desenvolvimento de RD e das demais complicações microvasculares³¹. Estes dados corroboram os reportados pelo grupo ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*), que verificou que a ocorrência de RD deu-se em apenas 7,3% dos indivíduos no grupo sujeito a terapêuticas farmacológicas de associação para o controlo glicémico, comparado com os 10,4% de ocorrência naqueles que receberam terapêuticas padrão³². Por outro lado, os dados destes dois estudos demonstraram a dificuldade em manter os níveis de glicémia controlados em indivíduos com DM2, principalmente por longos períodos. Por essa razão, a intervenção a nível de outros factores de risco, como a hipertensão, tem sido alvo de interesse, num esforço para diminuir a perda da visão devida à RD³³. A hipótese de que o aumento da pressão sanguínea, através do seu efeito no aumento do fluxo sanguíneo, pode provocar lesões nas células endoteliais da retina em indivíduos diabéticos³³ é sustentada por estudos clínicos em que se observou uma associação entre a hipertensão e a

gravidade da RD^{31;34}. Sabe-se que indivíduos com DM2 possuem um risco 2,5 vezes superior de apresentar hipertensão do que indivíduos sem DM2, e que a hipertensão é mais prevalente nesses indivíduos do que naqueles que não apresentam a doença³⁰.

O grupo de estudo ACCORD³² sublinha ainda a importância dos benefícios de um controlo glicémico adequado na redução da progressão da RD, bem como a aposta no tratamento rigoroso da dislipidémia, já que os níveis elevados de colesterol e triglicéridos parecem ter uma importância significativa como factores de risco adicionais para o desenvolvimento da RD e perda da visão³⁵.

Assim, e no que diz respeito aos factores de risco para a RD, existem fortes evidências de que a longa duração da DM, o deficiente controlo glicémico e a pressão arterial elevada são os mais relevantes factores de risco modificáveis responsáveis pelo aparecimento e progressão da RD²⁰.

Patofisiologia da retinopatia diabética

A RD resulta de alterações celulares e bioquímicas que à partida não são clinicamente evidentes³⁶. Inicia-se com o aparecimento de lesões microvasculares da retina, decorrentes de uma sucessão de acontecimentos que incluem microaneurismas, hemorragias, exsudados duros, manchas algodinosas e alterações microvasculares intraretinianas³⁷. A RD é uma doença que pode conduzir à cegueira por duas vias principais: angiogénese e neovascularização excessivas e desorganizadas, que conduzem a hemorragias intraoculares e possível descolamento de retina com consequente grave perda visual, e lesão localizada na mácula com perda significativa da visão central^{26;38}. Historicamente a classificação da RD baseia-se em evidências oftalmoscópicas de gravidade crescente, que levam a uma classificação que abrange desde a ausência de retinopatia, a vários estadios de retinopatia não proliferativa, até retinopatia proliferativa avançada²⁷. Porém, esta classificação pode não reflectir a gravidade da doença em termos funcionais, uma vez que a presença de maculopatia diabética pode surgir em qualquer um dos estadios, com grave compromisso funcional da visão, mesmo em presença

de poucos sinais oftalmoscópicos¹⁹. A RD é uma microangiopatia que afecta primariamente as arteríolas pré-capilares, os capilares e as vénulas pós-capilares da retina, sendo as alterações vasculares características quer de oclusão microvascular, quer de extravasamento vascular^{39;40}. A oclusão microvascular resulta de alterações capilares (perda de pericitos, espessamento da membrana basal, proliferação de células endoteliais) e de alterações hematológicas (formação de *rouleaux* de hemácias, aumento da adesividade e agregação plaquetárias). Esta oclusão microvascular conduz à não perfusão retiniana com consequente isquémia da mesma³⁸. Como resposta à isquémia retiniana, surgem anomalias microvasculares intraretinianas (IRMA – *intraretinal microvascular abnormalities*) e neovascularização da retina e nervo óptico²⁸. Por sua vez, o extravasamento vascular deve-se a alterações da barreira hematoretiniana interna, com extravasamento de componentes do plasma para a retina²⁶, sendo que o enfraquecimento localizado da parede vascular origina os microaneurismas visíveis na oftalmoscopia⁴¹. As consequências deste extravasamento vascular serão o aparecimento de hemorragias retinianas e do edema retiniano que poderá ser localizado ou difuso⁴². De acordo com o aparecimento, localização e extensão de todas estas alterações, a RD será classificada em termos de gravidade⁴⁰.

Com a progressão da diabetes, a hiperglicémia provoca anomalias no fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular, o que se vai reflectir na diminuição da actividade dos vasodilatadores tais como o óxido nítrico, aumento da actividade de vasoconstrictores como a angiotensina II e aumento de expressão e libertação de factores de permeabilidade vascular como o VEGF²⁴. Este último é expresso pelas células endoteliais da retina, pelos pericitos e pelas células epiteliais da camada pigmentar em resposta à hipóxia, estimulando a angiogénese e a neovascularização e aumentando a permeabilidade capilar⁴¹.

Várias alterações bioquímicas têm sido sugeridas para explicar como a hiperglicémia leva ao desenvolvimento da RD, embora nenhuma esteja cabalmente identificada como responsável: 1) a via

do poliol, 2) a activação da proteína cinase C (PKC), 3) a formação e acumulação dos produtos finais de glicação avançada (AGE) e 4) a sobrecarga oxidativa resultante de vários mecanismos. Todos estes mecanismos têm sido implicados no desenvolvimento da RD, pois representam vias cruciais para o desenvolvimento de anomalias na retina neural e nos capilares localizados no interior da retina^{2,30} – Figura 1. Estes mecanismos são na sua maioria dependentes do excesso de glucose nas células da retina, resultando num aumento dos níveis de glucose intracelular²⁶.

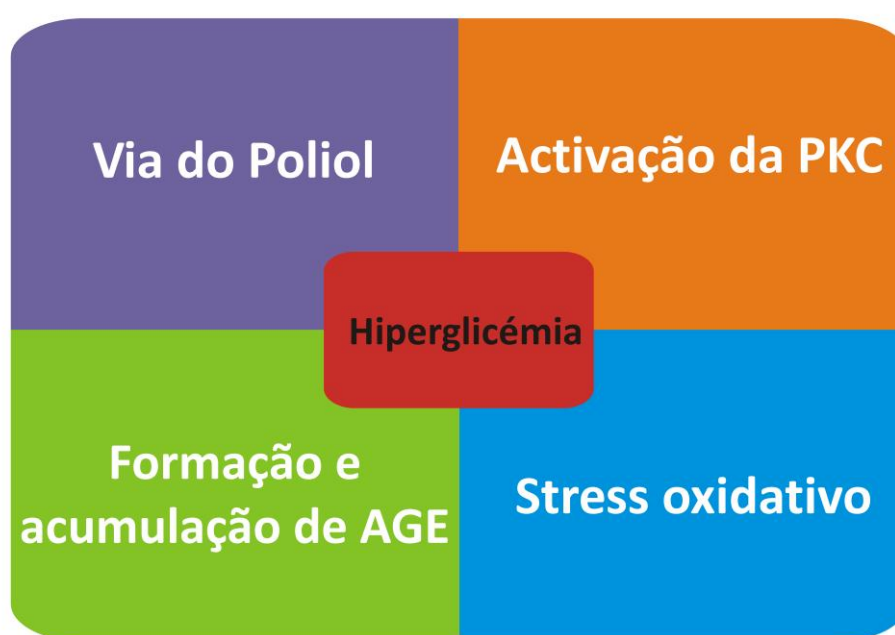


Figura 1 – As quatro possíveis vias pelas quais a hiperglicémia poderá conduzir ao aparecimento das comorbilidades na DM: o aumento do fluxo pela via do poliol, a activação das isoformas da proteína cinase C (PKC), o aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE) e a sobrecarga oxidativa.

Via do poliol

Embora os principais substratos da via do poliol sejam os aldeídos, açúcares como a glicose e a galactose podem ser metabolizados pela aldose reductase⁴³, o primeiro enzima desta via. A aldose

reductase possui baixa afinidade para com a glicose nas concentrações normais encontradas em não-diabéticos, pelo que esta via contribui marginalmente para o metabolismo da glicose²⁴. No entanto, na presença de elevados níveis de glicose intracelular, a metabolização desta pela via de poliol torna-se importante⁴⁴. A aldose reductase reduz a glicose a sorbitol, usando o NADPH como co-factor, e o sorbitol formado é posteriormente metabolizado em frutose pelo sorbitol desidrogenase, utilizando NAD⁺ como co-factor⁴⁵. Os efeitos decorrentes desta sucessão de reacções são variados: o sorbitol é um álcool polihidroxilado e, conseqüentemente, uma molécula hidrofílica, que não se difunde facilmente através das membranas celulares, acumulando-se intracelularmente com possíveis conseqüências osmóticas⁴⁶; a frutose produzida pela via do poliol pode ser fosforilada a frutose-3-fosfato, que origina 3-desoxiglucosona, ambos potenciais agentes de glicação que contribuem para a formação de AGEs^{43;44}; o consumo de NADPH pela aldose reductase leva à diminuição da sua disponibilidade para o glutathione reductase², o que é crítico para a manutenção dos níveis intracelulares do glutathione (GSH), conduzindo, conseqüentemente, a uma diminuição da capacidade das células para responder à sobrecarga oxidante⁴⁶; por outro lado, a utilização do NAD⁺ pelo sorbitol desidrogenase leva ao aumento da razão NADH/NAD⁺, denominada de “pseudo-hipóxia”, e associada a uma multiplicidade de alterações metabólicas e de vias de sinalização que se sabe alteram as funções celulares⁴⁴. Desta forma, a activação da via do poliol pode desencadear uma série de mecanismos que levam à lesão celular,, contribuindo assim para o desenvolvimento da RD^{15;47} – Figura 2.

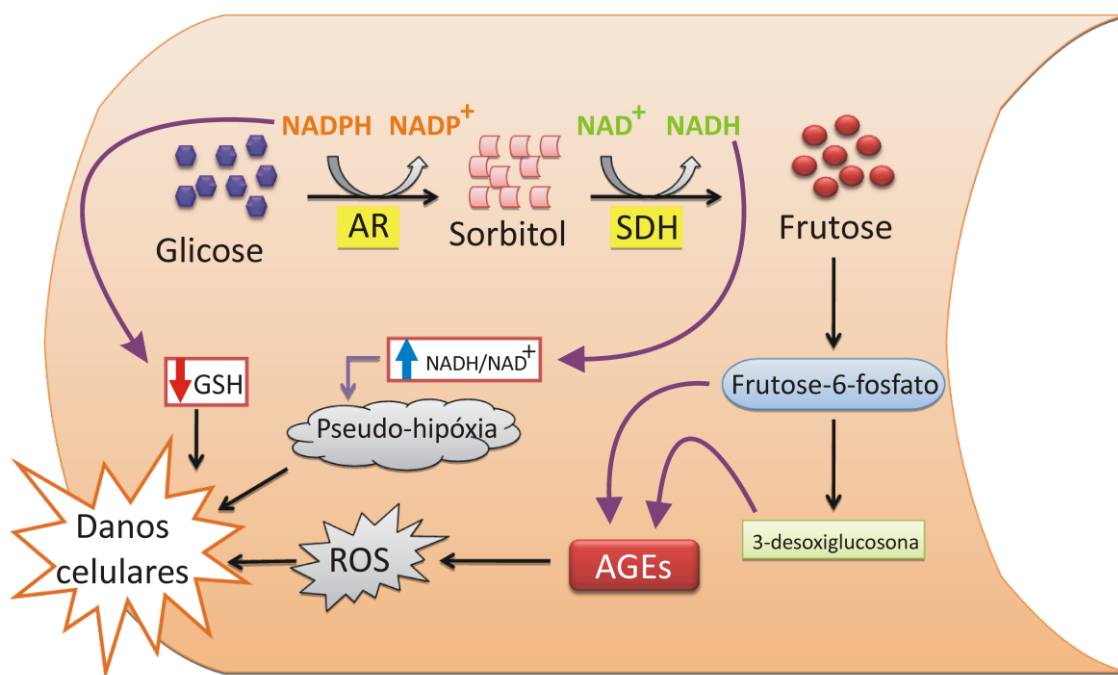


Figura 2 – Resumo das reacções decorrentes da via do poliol, que culminam em danos a nível celular e que podem contribuir para o aparecimento e desenvolvimento da RD. Abreviaturas: AR – aldose reductase; SDH – sorbitol desidrogenase; GSH – glutatono; AGEs – produtos finais de glicação avançada; ROS – espécies reactivas de oxigénio.

Activação da proteína cinase C

Uma das proteínas activadas pela glicose é a proteína cinase C (PKC)²⁴, e a DM leva à activação nos vários tecidos alvo de isoformas específicas da PKC. Vários estudos indicam que a inibição da PKC previne várias anomalias vasculares em ratos diabéticos, e a expansão mesangial e disfunção glomerular em ratinhos db/db, sugerindo que as várias isoformas da PKC são importantes mediadoras de alterações bioquímicas e funcionais nos vasos de diabéticos⁴⁸. Sendo assim, a activação da PKC é outra das vias implicadas no desenvolvimento da RD, estando relacionada com o aumento da permeabilidade vascular, alteração do fluxo sanguíneo e estimulação da neovascularização⁴⁹.

Formação e acumulação de produtos finais de glicação avançada (AGE)

Os AGEs são moléculas complexas e heterogéneas, que danificam as células por pelo menos três mecanismos básicos: (1) as proteínas intracelulares modificadas pelos AGEs ficam funcionalmente alteradas; (2) os componentes da matriz extracelular modificados pelos AGEs interagem de forma anómala com outros componentes da matriz da célula e com integrinas; (3) as proteínas plasmáticas que sofrem alteração pelos AGEs activam o seu receptor (RAGE) nas células endoteliais, células mesangiais e macrófagos, induzindo a produção de espécies reactivas de oxigénio²⁴. O aumento dos AGEs é acompanhado pelo aumento do RAGE, e o sistema AGE-RAGE parece desempenhar um papel central no desenvolvimento e progressão de complicações micro- e macrovasculares⁵⁰. A ocupação do RAGE pelos AGEs activa a sua cascata de sinalização e aumenta a sobrecarga oxidativa e a resposta inflamatória em células da parede vascular, contribuindo assim para o desenvolvimento e progressão da RD^{51;52}.

A glucose, por vias não-enzimáticas, reage com aminoácidos e ácidos gordos para formar bases de Schiff e produtos de Amadori que, após uma complexa cascata de reacções, formam os produtos finais de glicação avançada (AGEs)^{2;53}. Fisiologicamente, a glicação avançada desempenha um importante papel na identificação de moléculas senescentes, que são clivadas e removidas⁵⁴. No entanto, nos distúrbios metabólicos, como é o caso da diabetes, há um aumento acentuado no número de factores que promovem a formação dos AGEs em vários órgãos e tecidos alvo, nomeadamente a retina^{54;55}. O impacto dos AGEs nas células da retina está relacionado com o facto de a sua acumulação, ao longo do tempo, conduzir à formação de ligações cruzadas de várias proteínas e à geração de espécies reactivas de oxigénio²⁶, poderosos agentes oxidantes. A formação e acumulação dos AGEs têm ainda como alvo a membrana basal, limitando a capacidade de fixação dos pericitos e levando directamente à lesão tecidual⁵⁶ – Figura 3.

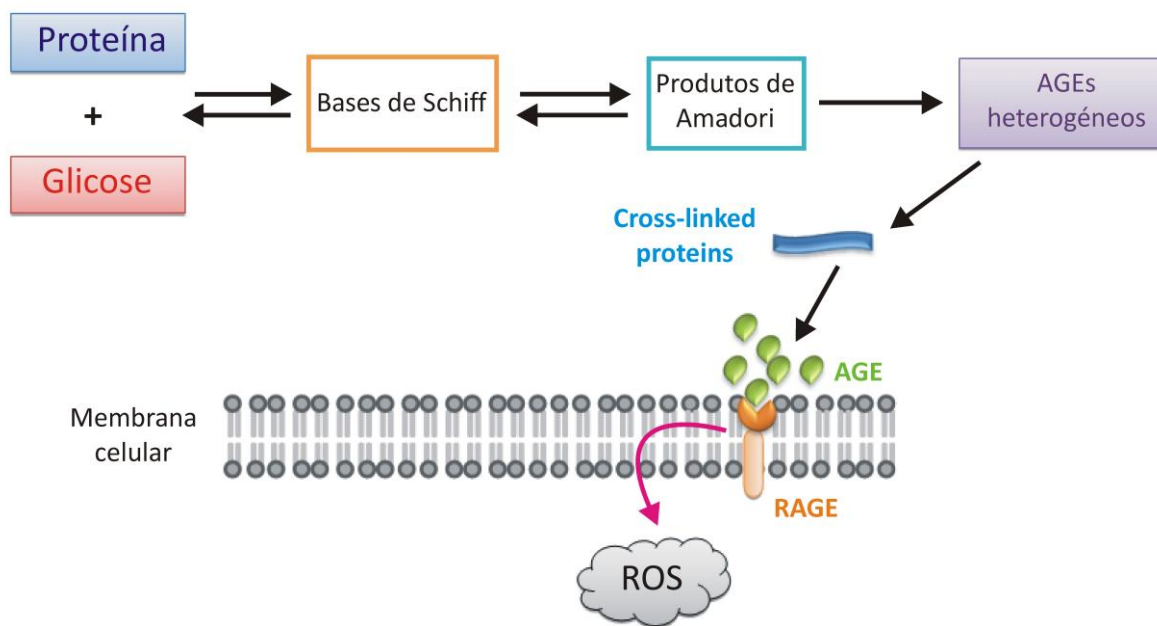


Figura 3 – Formação dos AGEs na presença de hiperglicemia. O processo inicia-se com a conversão reversível das bases de Schiff, os re-arranjos dos produtos de Amadori e uma série de reacções complexas que culminam na formação de AGEs. A interação entre o AGE e o RAGE conduz à geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS), com o subsequente processo inflamatório, activação de macrófagos e plaquetas, e formação de trombos, que em conjunto desempenham um importante papel no desenvolvimento e progressão das complicações diabéticas.

De acordo com Adamis e Berman⁵⁷, alguns estudos têm sugerido que, para além destas vias metabólicas, alguns mecanismos imunológicos desempenham um papel importante na patogénese da RD, reflectindo-se, por exemplo, no edema. Estudos envolvendo tanto resultados pré-clínicos como clínicos suportam o conceito de que a RD é uma manifestação inflamatória de baixo grau, mas crónica, na qual um fluxo de efectores inflamatórios, citocinas e leucócitos, são responsáveis pela neovascularização induzida pela isquémia e pelas lesões da retina. No entanto, esta hipótese necessita de corroboração⁵⁸.

Susceptibilidade genética para a retinopatia diabética

Embora o aumento recente da prevalência da DM seja em grande parte atribuído a factores de risco não-genéticos, os aspectos ambientais certamente aceleram o aparecimento da doença na presença de predisposição genética¹² e, consequentemente, o mesmo também se verificará com a ocorrência das suas complicações, como a RD¹³.

Como já referido, estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência da RD aumenta com a duração da DM e que o controlo intensivo da glicémia pode atrasar o desenvolvimento da RD⁵⁹. No entanto, muitas vezes tal não se verifica. Existem casos em que indivíduos com bom controlo glicémico desenvolvem RD em idades precoces¹⁴, e, em contrapartida, aqueles que não desenvolvem complicações retinianas após uma longa duração da doença e na presença de hiperglicémia não controlada⁶⁰. Por outro lado, e de acordo com estudos realizados em indivíduos diabéticos, verifica-se uma substancial variabilidade nas diferentes fases da RD, que não é totalmente explicada pelos dois factores de risco referidos^{61;62}.

O facto de a prevalência da RD diferir conforme a etnia é apontado como outro argumento a favor da existência de uma susceptibilidade genética. O estudo Multi-Étnico de Aterosclerose (MESA) encontrou diferenças moderadas na prevalência da RD consoante a etnia: 37,4% em hispânicos, 36,7% em afro-americanos, 25,7% em sino-americanos e 24,8% em caucasianos⁶³. Tem também sido sugerido que, independentemente do controlo glicémico e de factores de risco ambientais, indivíduos hispânicos com DM desenvolvem RD mais precocemente e a sua progressão é mais rápida, quando comparados com afro-americanos ou americanos-caucasianos⁶⁴.

De acordo com Arar et al.⁶⁴, e num estudo em que foi avaliada a hereditariedade da RD em descendentes americanos não nativos, demonstrou-se uma relação familiar significativa em membros de múltiplas famílias com DM e a gravidade da RD. Por outro lado, Hietala et al.²⁹, ao avaliar a

hereditariedade da RD proliferativa em diabéticos tipo 1 finlandeses, estimaram o risco familiar da RD em 168 dos 188 irmãos avaliados, mais uma vez sugerindo uma contribuição genética para o aparecimento e desenvolvimento da RD.

Em suma, sendo a patogénese da RD multifactorial, há fortes indícios que suportam a existência de factores de risco genéticos que podem desempenhar um papel importante nesta patologia²⁰.

Genes candidatos para a retinopatia diabética

Embora inúmeros genes e respectivos polimorfismos tenham sido implicados na patogénese da RD, poucos estudos têm identificado uma forte associação entre um só gene e a frequência ou gravidade desta. Dos vários genes candidatos a estar envolvidos na RD^{15;61}, este trabalho centrou-se em quatro que têm sido alvo de particular interesse, e que parecem contribuir para o aparecimento e desenvolvimento da RD – VEGF, RAGE, PON1 e PON2.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica com 45 KDa, cujo gene possui oito exões, e que tem sido apontado como um importante mediador associado à isquémia intra-ocular e neovascularização retiniana⁶⁵. As suas 4 isoformas, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E pertencem à família dos factores de crescimento angiogénicos, sendo os outros 2 membros conhecidos desta família o factor de crescimento placentário e o PDGF⁶⁶. Todos os genes da família do VEGF sofrem *splicing* alternativo, originando várias isoformas (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆)⁶⁷, que diferem no tamanho da cadeia de aminoácidos, na actividade mitogénica, na afinidade de ligação aos receptores do VEGF e na afinidade de ligação à heparina³⁴. Dentre estas, a forma VEGF₁₆₅ é a mais abundante e corresponde

a um polipéptido de 23kDa, constituindo um monómero do VEGF-A homodimérico humano, normalmente referido por VEGF⁶⁷.

O VEGF, inicialmente conhecido como factor de permeabilidade vascular, foi subsequentemente reconhecido como um factor angiogénico e como um mitogénio específico para células endoteliais vasculares⁶⁸. A actividade mitogénica do VEGF está demonstrada em células endoteliais linfáticas e vasculares, mas não em níveis significativos em outros tipos de células³⁶. Possui também características vasodilatadoras, promove a migração das células endoteliais e é um anti-apoptótico⁶¹. Vários mecanismos têm sido implicados na regulação da expressão do VEGF, sendo a hipóxia um dos mais importantes^{30;69}. Em culturas de células retinianas, como células de Muller e outras células da glia, a expressão do VEGF é substancialmente aumentada pela hipóxia e por mediadores inflamatórios, devido à sobrecarga oxidante³⁶. De acordo com Aiello et al.⁴⁹, a expressão do VEGF nas células da retina está aumentada de 3 a 30 vezes devido à hipóxia, que promove a expressão de um conjunto de factores de crescimento que aumentam a expressão do gene do VEGF, conduzindo à neo-vascularização⁷⁰. A activação transcricional que regula o aumento do VEGF em resposta à hipóxia é mediada principalmente pelo factor induzido pela hipóxia-1 (HIF-1). O HIF-1 é uma proteína heterodimérica, que consiste em duas subunidades, o HIF-1 α e o HIF-1 β , e pensa-se que é um dos grandes responsáveis pela sobre-expressão do VEGF na isquémia da retina³⁰. Adicionalmente, a produção aumentada desta citocina pode resultar dos AGEs decorrentes da hiperglicémia⁷¹, que induzem a expressão do VEGF através da sobrecarga oxidante e activação da PKC nas células endoteliais da coroideia⁶⁹.

O VEGF desempenha um papel central como mediador microvascular, estimulando a proliferação de vasos dos pericitos e no endotélio dos vasos retinianos, levando à apoptose celular⁶⁹, e induzindo alterações precoces na RD, tais como leucostasia, ruptura da barreira hemato-retiniana e edema macular⁷². Na retina são várias as células que produzem VEGF, incluindo células do epitélio pigmentar,

endoteliais, células de Mueller e outras células da glia⁷³, verificando-se no entanto que em olhos de indivíduos saudáveis o VEGF está presente em níveis muito baixos nessas células, enquanto que em olhos de indivíduos diabéticos o VEGF está em maiores concentrações, sendo estas ainda maiores nos casos de RD proliferativa⁶⁹. Um número considerável de ensaios clínicos tem mostrado uma forte correlação entre o aumento da concentração intravascular do VEGF e o desenvolvimento da RD proliferativa^{72;74-76}. Dado o VEGF parecer desempenhar um papel importante na fisiopatologia da RD, é considerado um candidato plausível para esta patologia⁷⁶.

Várias variantes polimórficas do gene do VEGF têm sido investigadas como factores de susceptibilidade para a RD em várias populações, tendo-se vindo a verificar que, dependendo da população, esses podem ou não estar relacionados com a ocorrência e progressão da RD. Dois polimorfismos na região 5'-UTR no gene do VEGF parecem aumentar a sua actividade promotora basal, uma transversão G – C na posição -634 (-634G/C) e uma transição C – T na posição -460 (-460C/T)⁶⁹. O alelo C do polimorfismo -634G/C foi descrito como estando associado à ocorrência de RD em populações japonesas⁷⁷, indianas⁶⁵ e polacas⁶⁹. No entanto, um estudo realizado numa população de diabéticos com descendência europeia não observou associação do polimorfismo -634G/C com a ocorrência da RD, mas verificou uma maior frequência do genótipo CC em pacientes com RD proliferativa (RDP), sugerindo que a presença do alelo -634C seja um factor de risco independente para a RDP em DM2⁷⁸. O alelo C do polimorfismo -460C/T parece estar associado à ocorrência⁷¹, progressão e proliferação da RD⁷⁹ em populações caucasianas. No entanto, e dada a escassez de informação e ausência de relação causal, permanece fundamental a continuação do estudo da influência destes e outros polimorfismos do VEGF na RD.

Receptor for advanced glycation end products (RAGE)

O RAGE pertence à super-família das imunoglobulinas de superfície celular, é composto por 332 aminoácidos e compreende três domínios extracelulares, um do tipo V e dois do tipo C⁵¹ e um citoplasmático com 43 aminoácidos, fortemente carregado^{80;81}, essencial para a sinalização do RAGE⁸². A estrutura determinante no receptor que medeia a ligação aos AGEs está contida no terminal N do domínio V⁸³. O RAGE é um receptor multifuncional, com vários ligandos para além do AGE, incluindo péptidos β -amilóides, amiloide A, s100 calgranulinas e anfoterina⁵⁴. Análises estruturais da interacção entre o RAGE e os seus ligandos mostram que o receptor reconhece estruturas tridimensionais, tais como folhas β e fibrilhas, e não sequências específicas de aminoácidos⁸⁴.

Em condições fisiológicas normais o RAGE é expresso em níveis baixos pelas células endoteliais, monócitos, células musculares lisas e células epiteliais glomerulares⁵⁰. No entanto, foram identificados, tanto em modelos animais como em seres humanos diabéticos, níveis elevados de RAGE na retina, células mesangiais glomerulares e em vasos da aorta, concomitantemente com a acumulação de AGEs⁵⁵. Na DM a estimulação permanente do RAGE pelos elevados níveis circulantes de AGEs, aumenta a expressão do receptor e a activação das vias pró-inflamatória e pró-coagulante, levando à disfunção vascular^{55;81}.

O gene do RAGE localiza-se em 6p21.3 no *locus* MHC Classe III, é composto por 11 exões^{50;55}, e é considerado o maior complexo de histocompatibilidade de entre os genes da classe II e III⁷⁹. A sua transcrição, que pode ser constitutiva ou indutível⁵⁴, é controlada por uma série de factores, incluindo SP-1, AP-2, NF- κ B e NF-IL6, e depende do tipo de célula e do estágio de desenvolvimento, sendo constitutiva na fase de desenvolvimento embrionário e regulada na idade adulta⁷⁸.

Estão actualmente identificados aproximadamente 30 polimorfismos no gene do RAGE⁸², e tem sido proposto que alguns desses polimorfismos podem alterar as reacções que decorrem da ligação do

RAGE com os AGEs, e assim influenciar o desenvolvimento de complicações diabéticas microvasculares⁸³, e consequentemente a RD.

Dos vários polimorfismos do RAGE com possíveis associações ao desenvolvimento da RD, os mais relevantes parecem ser o -374T/A e o -429T/C. O alelo A do polimorfismo -374T/A pode ser um factor protector para complicações vasculares na DM2, especialmente em caucasianos⁵⁰, e o mesmo polimorfismo também foi associado à RD não proliferativa em populações indianas, com maior frequência do alelo T⁸⁴. Para além deste, os polimorfismos Gly82Ser e -429T/C podem aumentar o risco de ocorrência de RD em populações indianas⁸⁵ e caucasianas⁵⁵, respectivamente. Em populações caucasianas, o alelo C do polimorfismo -429T/C apresenta uma frequência aumentada em pacientes com RD⁵⁵. Contudo, um estudo realizado em indivíduos chineses, avaliando os polimorfismos -374T/A e -429T/C, não observou nenhuma associação com a RD⁸⁶.

Apesar de existirem vários estudos, em várias populações diferentes, de etnias diferentes, que apontam para polimorfismos no gene do RAGE como possivelmente envolvidos no desenvolvimento e/ou na progressão da RD, existe claramente ainda muita controvérsia, tornando-se necessário a realização de mais estudos que possam clarificar e identificar os genótipos de risco.

Genes da Paraoxonase sérica humana (PON1 e PON2)

A família multigénica da PON é composta por três genes adjacentes: PON1, PON2 e PON3, localizados em 7q21.3-q22.1⁸⁷. Estes três genes possuem aproximadamente 60% a 70% de homologia na sequência de aminoácidos e de nucleótidos, respectivamente⁸⁸. A PON1 e a PON3 são expressas principalmente no fígado e secretadas para a circulação sistémica em associação com as HDLs, enquanto a PON2 é expressa de forma ubíqua⁸⁷.

A proteína PON1 é composta por 355 aminoácidos e tem uma massa molecular de 43-45kDa⁸⁹. A PON1 foi inicialmente identificada pela sua capacidade de hidrolisar compostos organofosforados e ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos⁹⁰. Entretanto, o potencial interesse pela PON1 surgiu pelo efeito protector que exerce sobre as LDL e as HDL⁹¹. A associação da PON1 com as HDL permite a degradação de fosfolípidos oxidados das lipoproteínas e desempenha um papel importante no sistema antioxidante do organismo⁹². Porém, alterações de forma e tamanho das HDL podem influenciar fortemente a afinidade de ligação e estabilização com a PON1 e resultar na redução da capacidade antioxidante⁸⁸. A PON1 pode ainda desempenhar um importante papel na aterosclerose, evitando a deposição de lipoperóxidos e possíveis lesões na parede das artérias^{88;93}.

A PON2 é uma proteína com 39 kDa, associada à membrana celular, e amplamente expressa em células vasculares e em vários tecidos, incluindo o coração, rins, fígado, pulmão, placenta, intestino delgado, baço e estômago⁹⁴. A PON2 possui propriedades anti-inflamatórias e a mesma função antioxidante que a PON1, participando no metabolismo de lípidos e lipoproteínas^{93;95}. De acordo com Gupta et al.⁹⁶, as células que expressam PON2 em grandes quantidades oxidam as LDL em menor quantidade e apresentam uma sobrecarga oxidativa consideravelmente menor, quando expostas a H₂O₂ ou fosfolípidos oxidados.

Da família da PON, a PON3 é a menos estudada, sendo escassa a informação disponível. Esta proteína é composta por 354 aminoácidos e tem uma massa molecular de 39,6 kDa⁹⁷. É considerada uma glicoproteína com propriedades multi-enzimáticas e actividade antioxidante, podendo também participar na oxidação das LDLs⁹⁷.

Existem dois polimorfismos identificados na região codificante da PON1, M55L e Q192R, e dois também identificados na região codificante da PON2, G148A e C310S⁸⁸. Kao et al⁹⁸ investigaram os polimorfismos M55L e Q192R do gene da PON1 e a sua importância na RD, tendo encontrado uma

forte associação entre o primeiro polimorfismo e o desenvolvimento da RD, concluindo que a Leucina 55 é um factor de risco para a ocorrência da patologia. Mackness et al. mostraram que o polimorfismo C310S da PON2 pode influenciar ambos os polimorfismos da PON1 e que a interação entre ambos pode contribuir para o controlo glicémico em indivíduos com DM2 agravada pela RD⁹³.

Apesar dos escassos estudos sobre o papel das PONs e dos seus polimorfismos no desenvolvimento e progressão da RD, a associação das PONs com a ocorrência de doenças crónicas, nomeadamente doenças cardiovasculares e DM2, tem sido largamente documentada^{90;99-110}.

Actividade enzimática da PON1

A PON é o principal enzima representante das esterases, hidrolisa as ligações triésteres do ácido fosfórico, com afinidade específica para os organofosforados. A origem do nome advém de um dos substratos mais utilizados *in vivo*, o paraoxon. No entanto, inúmeros possíveis substratos têm sido estudados, como o fenilacetato e lactonas^{111;112}. De entre as três PONs conhecidas, a PON1 foi a primeira a ser identificada sendo a mais estudada¹¹³. Acredita-se que polimorfismos no gene da PON1 sejam responsáveis por mais de 60% da variação inter-individual na concentração do enzima e na actividade enzimática; porém, as três PONs mostram ser moduladas por várias moléculas nutricionais e farmacológicas e algumas condições patofisiológicas, como a inflamação e o *stress* oxidativo¹¹¹.

Terapêutica

Actualmente existem várias opções terapêuticas para a RD: a fotocoagulação laser é classicamente o tratamento de primeira linha na RD não proliferativa grave, proliferativa e no EMD clinicamente significativo^{36;40}, tendo sido demonstrado no ETDRS que a fotocoagulação reduz o risco de perda de

visão moderada, em particular em doentes com EMD. Os corticoesteróides, incluindo triancinolona intra-vítrea (IVT) ou implantes intra-vítreos de libertação lenta, têm crescido em popularidade para o tratamento da EMD, devido aos seus efeitos e propriedades angiostáticas e antipermeabilidade¹¹¹. Apesar de a fotocoagulação laser continuar a ser a primeira indicação terapêutica no EMD, novas opções estão a ser consideradas. Muitos estudos prospectivos de medicamentos anti-VEGF no tratamento da RD foram recentemente publicados, e alguns estão ainda em curso. Três agentes farmacológicos anti-VEGF estão disponíveis comercialmente: Pegaptanib, Ranibizumab e Bevacizumab. No entanto, a segurança e a eficácia destes agentes para o tratamento da RD ainda não foi estabelecida, e como tal aguardam-se os resultados dos ensaios clínicos controlados⁶⁶.

Com base no exposto, pretendeu-se com este trabalho contribuir para o estudo da susceptibilidade genética para a RD em indivíduos com DM2, com RD não proliferativa ou proliferativa, com ou sem EMD associado, por forma a tentar identificar factores de risco genéticos para o aparecimento e progressão da RD, e assim estabelecer medidas preventivas e terapêuticas atempadas e mais eficazes para esta co-morbilidade, cada vez mais frequente entre os diabéticos.

OBJECTIVO

O objectivo primário da presente dissertação foi avaliar a influência dos polimorfismos -634C/G do VEGF, -374T/A do RAGE, Gln192Arg do PON1 e Cys310Ser do PON2 no aparecimento e progressão da retinopatia diabética em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. Como objectivo secundário avaliou-se a influência destes polimorfismos no aparecimento da diabetes mellitus tipo 2.

METODOLOGIA

As técnicas utilizadas para a determinação dos diferentes parâmetros estão descritas neste capítulo, com maior pormenor relativamente às técnicas optimizadas ou desenvolvidas durante o decurso do mestrado.

1. Amostra populacional

A população em estudo foi constituída por 129 indivíduos, 86 com DM2 e 43 controlos não diabéticos. Dos 86 indivíduos com DM2, 47 frequentavam as consultas de Oftalmologia do Hospital Professor Doutor Fernando da Fonseca, EPE e 39 as consultas de Oftalmologia do Instituto de Oftalmologia Dr. Gama Pinto. Os 43 controlos foram indivíduos dadores de sangue do Instituto Português de Sangue. Apenas os doentes seguidos nas consultas de Oftalmologia do Hospital Fernando da Fonseca possuem todos os parâmetros clínicos.

2. Colheita de sangue e soro

As amostras de sangue foram colhidas no Hospital Fernando da Fonseca, em simultâneo com a recolha de amostras a serem utilizadas nas análises de rotina dos pacientes incluídos no estudo. Foram colhidos dois tubos de 5ml de sangue, um tubo seco para obtenção do soro e subsequente determinação da actividade enzimática da paraoxonase, e outro tubo contendo K₃ EDTA para extracção de DNA. Os soros foram obtidos após centrifugação a 720xg durante 10 minutos.

3. Parâmetros Genéticos

3.1. Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA genómico a partir de sangue periférico humano total foi feita pela técnica de *salting out*, seguindo o protocolo de extração de DNA descrito por Coelho¹¹⁴. Para determinar o rendimento e o grau de pureza do DNA foi feita a leitura de absorvência aos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, por espectrofotometria. A integridade do DNA foi avaliada por electroforese em gel de agarose a 3% (m/v) em tampão TAE (Tris-Acetato 20 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) contendo 10 µg/ml de brometo de etídio¹¹⁴.

3.2. Identificação dos Polimorfismos

A genotipagem de cada um dos polimorfismos foi feita por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*).

3.2.1. Método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O princípio da técnica de PCR consiste em três passos fundamentais (Figura 3):

1. Desnaturação – a mistura reaccional, constituída por DNA, os *primers* específicos para a sequência a amplificar, dNTPs, DNA polimerase termoestável, MgCl₂ e tampão adequado, é aquecida a 93°C-95°C, para que a dupla hélice de DNA seja desnaturada.
2. Emparelhamento – a temperatura é reduzida a 50°C-75°C, dependendo da T_m (temperatura de *melting*) do duplex constituído pelos primers e DNA, para permitir o emparelhamento destes com o DNA.

3. Extensão – a temperatura é mantida a 72°C para que ocorra a síntese de DNA. Os passos 1 a 3 são repetidos, normalmente por 30 a 40 ciclos, de 0,5 a 3 minutos cada.
4. Extensão final – a temperatura é mantida a 72°C, durante 10 minutos, por forma a permitir a síntese completa das cadeias. Este passo pode ou não ser realizado, consoante necessário.

No primeiro ciclo o DNA colocado na mistura é utilizado como molde para a síntese de novas cadeias. Essas, por sua vez, serão utilizadas como molde para as cadeias subsequentes à medida que forem sintetizadas em cada um dos ciclos – daí a denominação reacção em cadeia – pelo que o número de cadeias de DNA pretendidas aumenta exponencialmente.

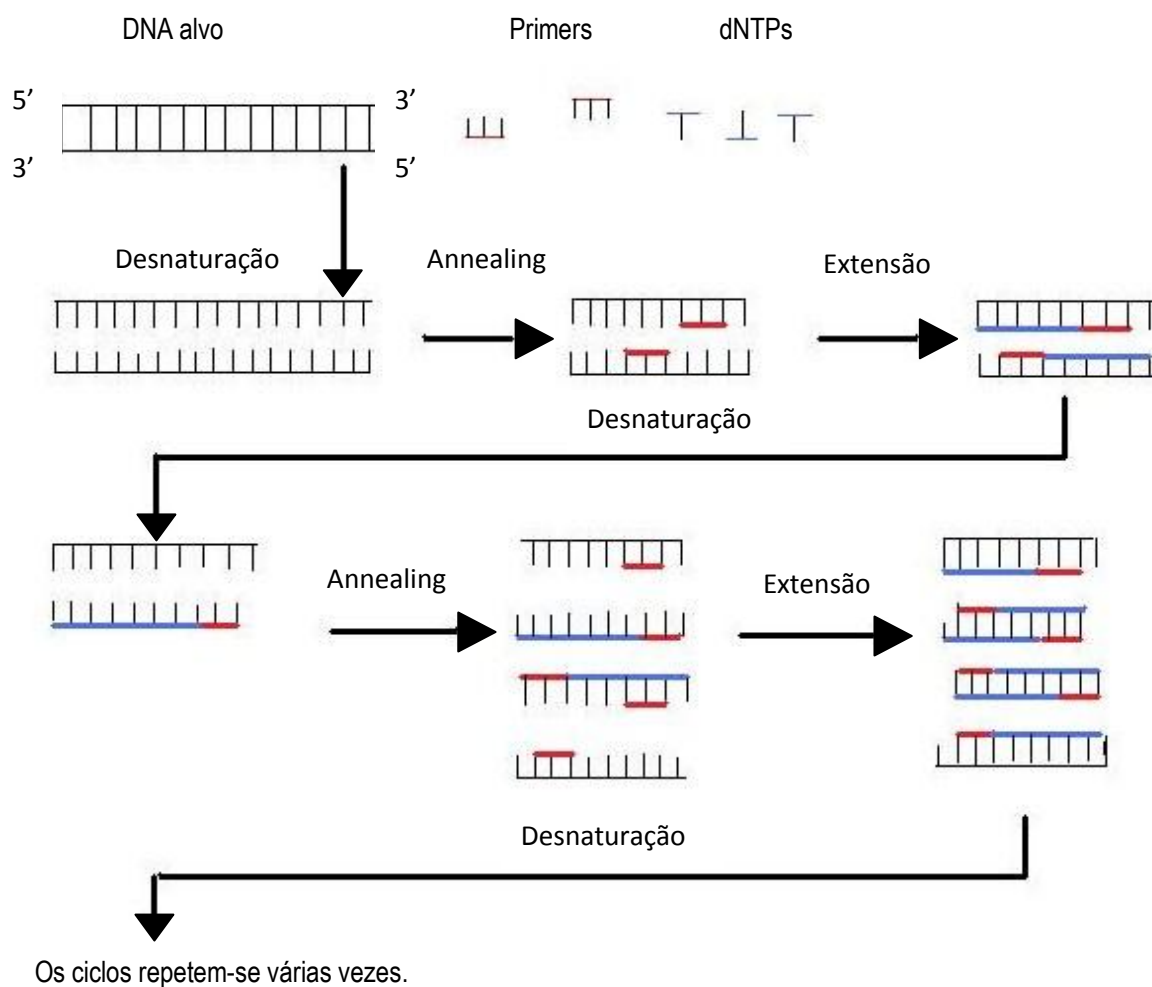


Figura 4: Ilustração do método de PCR

3.2.2. Método de PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*)

O PCR-RFLP consiste na amplificação de sequências de DNA por PCR, como referido acima, seguida da digestão dos fragmentos amplificados por um enzima de restrição adequado. Estes enzimas são endonucleases que reconhecem especificamente determinadas sequências de bases de DNA, apenas hidrolisando o DNA num local determinado, na presença de uma determinada sequência.

No presente estudo, as condições de PCR foram testadas e optimizadas tendo como referência as utilizadas e descritas por diferentes autores^{55;72;93}. Após optimização, seleccionamos as condições descritas nas Tabelas 1 e 2. De notar que em três dos polimorfismos estudados, e de acordo com os resultados das experiências de optimização, verificou-se necessário o uso de DMSO a 5% para estabilização da cadeia simples.

Os fragmentos resultantes da digestão foram separados em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio, e visualizados sob luz ultravioleta.

Tabela 1: Descrição das condições de PCR para cada um dos polimorfismos avaliados neste estudo.

GENE	POLIMORFISMO	PRIMERS	REAGENTES	CONDIÇÕES DE PCR
VEGF	-634C/G	F* 5'-GGCGCTCGGTGCTGGAATTT-3' R* 5'-AGCTAGCACTTCTCGCGGCT-3'	200ng DNA + 10pmol de cada primer + 200µM dNTP + 1,5mM MgCl ₂ + DMSO 5% + 1U Taq DNA polymerase + H ₂ O ⁷² .	Desnaturação inicial: 3min 95°C. Amplificação: 45s 95°, 45s 62°C, 45s 72°C x 40; 10 min. 72°C.
RAGE	-374T/A	F 5'-GGGGGCAGTTCTCTCCTC-3' R 5'-TCAGAGCCCCCGATCCTATTT-3'	200ng DNA + 10pmol de cada primer + 200µM dNTP + 1,5mM MgCl ₂ + 1U Taq DNA polimerase + H ₂ O ⁵⁵ .	Desnaturação inicial: 3min 95°C. Amplificação: 1 min 94°C, 1min 56°C, 1min 72°C x 30; 5min 72°C.
PON1	Gln192Arg	F* 5'- GAAGAGTGATGTATAGCCCCAG-3' R* 5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3'	200ng DNA + 10pmol de cada primer + 200µM dNTP + 1,5mM MgCl ₂ + DMSO 5% + 1U Taq DNA polimerase + H ₂ O ⁹³ .	Desnaturação inicial: 5 min 95°C. Amplificação: 45s 95°C, 45s 58°C, 45s 72°C x 45; 10min 72°C.
PON2	Cys310Ser	F* 5'-CTCCCTCGTCAGAGGTTCTCCGCATCCAGA-3' R* 5'-ACAGAACTTCCTTGGAGAACAGACCCATTG-3'	200ng DNA + 10pmol de cada primer + 200µM dNTP + 1,5mM MgCl ₂ + DMSO 5% + 1U Taq DNA polymerase + H ₂ O ⁹³ .	Desnaturação inicial: 5min 95°C Amplificação: 1min 94°C, 30s 61°C, 1min 72°C x 45; 5min 72°C.

Tabela 2: Descrição das condições de hidrólise para cada um dos polimorfismos avaliados neste estudo.

Poli-morfismo	Tamanho do fragmento	Enzima de restrição	Local de hidrólise	Fragmentos resultantes	Condições digestão
VEGF -634C/G	635pb	BsmFI	5'...GGGAC^ (N) ₁₀ ... 3'	302pb; 333pb	2U, 65°C, 16h; inativação 80°C, 20'
RAGE -374T/A	346pb	Tsp 590I	5'... ^AATT... 3'	105pb; 110pb; 131pb	1U, 65°C, 16h; inativação com 20mM EDTA, pH 8.0
PON1 Gln192Arg	99pb	Alw I	5'...GG^ATC (N) ₄ ...3'	66pb; 33pb	2U, 55°C, 16h; inativação 80°C, 20'
PON2 Cys310Ser	102pb	DdeI	5'...C^TNAG...3'	67pb; 35pb	2U, 37°C, 16h; inativação 65°C, 20'

Descreve-se de seguida em pormenor os passos dados para a optimização de um dos polimorfismos analisados, a título de exemplo para os restantes, cuja optimização foi feita do mesmo modo.

3.2.3. Polimorfismo do VEGF -634C/G

As condições de PCR foram testadas e optimizadas partindo das condições descritas por Szaflik et al.⁶⁹, optando-se, após sucessivos testes, pelas condições descritas na Tabela 1. À semelhança dos restantes polimorfismos, a identificação do polimorfismo VEGF -634C/G foi realizada por PCR-RFLP (GeneAmp PCR System 2700), sendo que, subsequentemente à amplificação por PCR, os 635 pares de base (pb) foram hidrolisados pelo enzima *BmsFI* (New England Biolabs), utilizando as condições descritas na Tabela 2. Este enzima hidrolisa o fragmento de DNA amplificado na posição 322, caso



A Figura 6 corresponde a uma fotografia de um gel de agarose, após a digestão dos fragmentos amplificados, identificando os alelos C e G do referido polimorfismo.

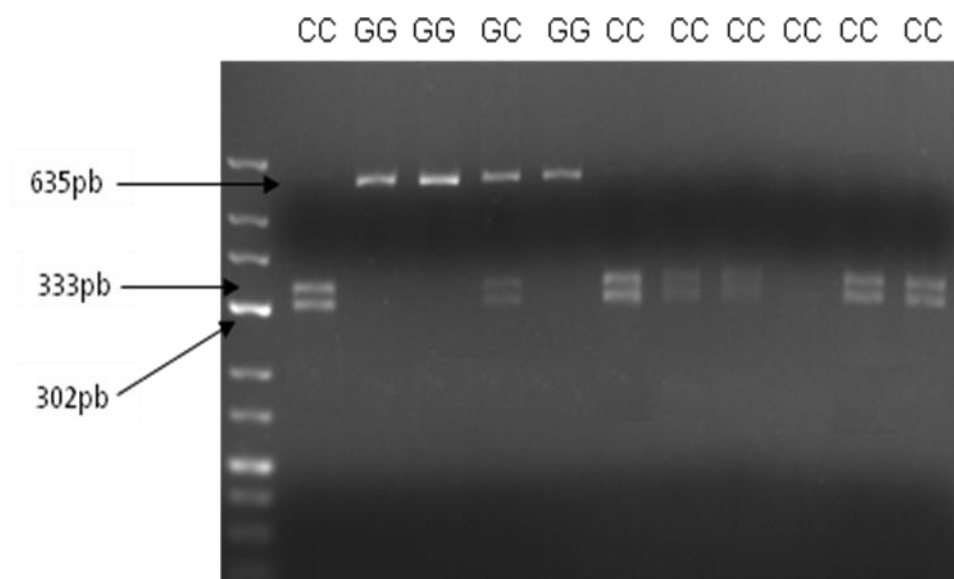


Figura 6: Fotografia do gel de agarose onde se identificam os diferentes genótipos do polimorfismo VEGF -634C/G, com os respectivos pares de base.

3.3. Determinação de parâmetros bioquímicos

3.3.1. Determinação da actividade enzimática da PON1

A escolha da PON1 para a determinação da actividade enzimática deve-se ao facto de esta ser, dentre os membros da família da paraoxonase, a que possui maior robustez quanto às funções enzimáticas que desempenha no organismo¹¹¹. Relativamente à PON2, sabe-se que está envolvida na redução do *stress* oxidativo e na protecção contra a aterosclerose, porém não se encontra associada às partículas de HDL no soro nem possui actividade organofosfatase e lactonase, como é o caso da PON1⁹⁰. A capacidade de hidrolisar compostos organofosforados levou a que fosse possível encontrar compostos que podem ser substratos PON1, sendo um dos mais usados o paraoxonee, o qual foi utilizado no presente estudo.

As condições de determinação espectrofotométrica da actividade da PON1 no soro foram estabelecidas após vários testes de optimização, tendo como base estudos já publicados^{91;93;112;113}. Todos os ensaios de optimização, quer da concentração de enzima (PON1) e de substrato (paraoxonee) a utilizar, bem como o tempo de reacção e as condições de armazenamento dos soros, foram estabelecidos pela autora e são detalhados nos pontos que se seguem.

3.3.1.1. Actividade enzimática da PON1

Para os ensaios iniciais usaram-se como condições as descritas anteriormente por vários autores^{93;115;116;117;118}. De acordo com esses autores, a actividade enzimática da PON1 pode ser avaliada empregando dois substratos distintos, o paraoxone ou o fenilacetato, sendo ambos medidos no soro. No presente estudo optou-se pelo dietil-*p*-nitrofenil-fosfato (paraoxone) (Sigma Chemical Co.), por ser o mais utilizado neste ensaio. O paraoxone é convertido em *p*-nitrofenol e dietil fosfato por acção da paraoxonase, sendo o *p*-nitrofenol detectado por espectrofotometria (Figura 7).

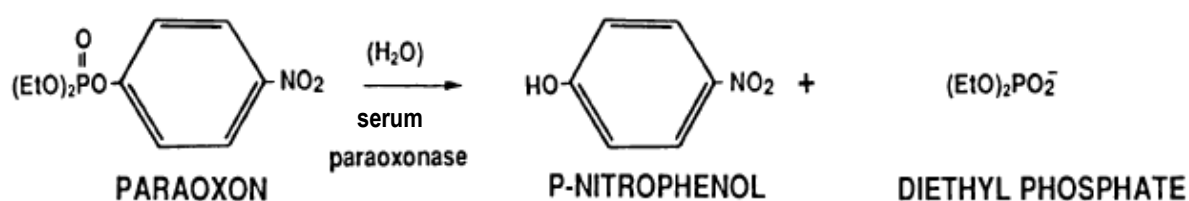


Figura 7: Esquema da reacção catalisada pelo enzima paraoxonase. Adaptado de Furlong et al.¹¹⁴.

Inicialmente, para cada ensaio, foi adicionado ao soro 5×10^6 mol/L de eserine (SIGMA), incubado à temperatura de 37°C por 10 minutos. A eserine tem a função de inactivar a actividade do butirilcolinesterase, elevado no soro de indivíduos diabéticos, e que interfere com a determinação da

actividade da PON1. A actividade da PON1 foi analisada seguindo a taxa de formação de *p*-nitrofenol por espectrofotometria, ao comprimento de onda de 405 nm¹¹³ durante 10 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. As misturas reacionais foram constituídas pelo soro (onde está presente o enzima), 1mL de tampão Tris/HCl (100mmol/L, pH 8.0), 2 mmol/L CaCl₂ e 2,5 mmol/L de paraoxonee, conforme descrito por Rajkovic et al.¹¹⁷, para um volume final de 1000 µL. A mistura reacional de referência continha todos os reagentes mencionados às mesmas concentrações, mas sendo o volume de soro substituído pelo mesmo volume de tampão Tris-HCl. A actividade da PON1 sérica foi expressa em µmol de *p*-nitrofenol/min/mL de soro e calculada recorrendo à Lei de Lambert-Beer, utilizando o coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol de $\varepsilon_{405} = 18,05 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ^{116;119}.

$$A = \varepsilon \ell C \Leftrightarrow \frac{\Delta A}{\text{min}} = \varepsilon \ell \frac{\Delta C}{\text{min}} \Leftrightarrow \frac{\mu\text{mol} / \text{ml}}{\text{min}} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{1}{\varepsilon \ell}$$

De acordo com a Lei de Lambert-Beer as intensidades de radiação incidente e emergente podem ser relacionadas com as concentrações da substância presente na solução, sendo possível traçar uma curva de absorvência *A* em função da concentração *c*. A partir dessa curva será possível determinar a concentração da substância que se pretende detectar em qualquer amostra dessa solução¹²⁰.

3.3.1.2. Optimização das condições do ensaio e armazenamento dos soros

Após verificação de que, nas condições de ensaio descritas pelos diferentes autores, a actividade da PON1 era mensurável no soro, procedeu-se à tentativa de optimização destas condições, em termos de concentração de substrato, volume de soro e tempo de ensaio. Todos os ensaios de optimização foram realizados utilizando um “pool” de soros obtidos de voluntários saudáveis.

Depois do ensaio otimizado, determinaram-se as condições de armazenamento dos soros a utilizar, pois estas não estão descritas e, por motivos logísticos, era necessário determiná-las.

3.3.1.2.1. Determinação do intervalo tempo

Com base nos resultados obtidos aquando dos ensaios iniciais, verificou-se que todos os ensaios apresentavam linearidade até 2 minutos e 24 segundos de reacção, pelo que o tempo escolhido para a cinética da actividade foi de 2 minutos.

3.3.1.2.2. Determinação da concentração do substrato (paraoxone)

A concentração de paraoxonee foi determinada através da equação de Michaelis-Menten. O modelo admite implicitamente que a catálise ocorre através da formação rápida e reversível de um complexo entre enzima e substrato, que, após a libertação do produto, ocorre a regeneração do enzima, e que a formação do produto é irreversível¹²¹. De acordo com este modelo, e variando apenas a concentração de substrato, mantendo todas as outras variáveis constantes, pode observar-se uma cinética de Michaelis-Menten. Utilizaram-se concentrações de paraoxonee entre 0,156 mM e 2,5 mM, obtidas através de diluições seriadas de uma solução-mãe de 2,5 mM. Utilizou-se para todos os ensaios um espectrofotómetro termostaticado a 37°C, sendo o soro equilibrado a esta temperatura por 10 minutos antes de iniciar os ensaios. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

O objectivo da realização destes ensaios consistiu em determinar a concentração mínima adequada de substrato a utilizar nos ensaios futuros.

A partir dos resultados obtidos, traçou-se o Gráfico I por regressão hiperbólica não-linear, descrita quantitativamente pela equação de Michaelis-Menten, usando o programa SPSS v17.0. Os valores de V_{\max} e K_m determinados foram $V_{\max}=6,165$ e $K_m=0,779$ mM.

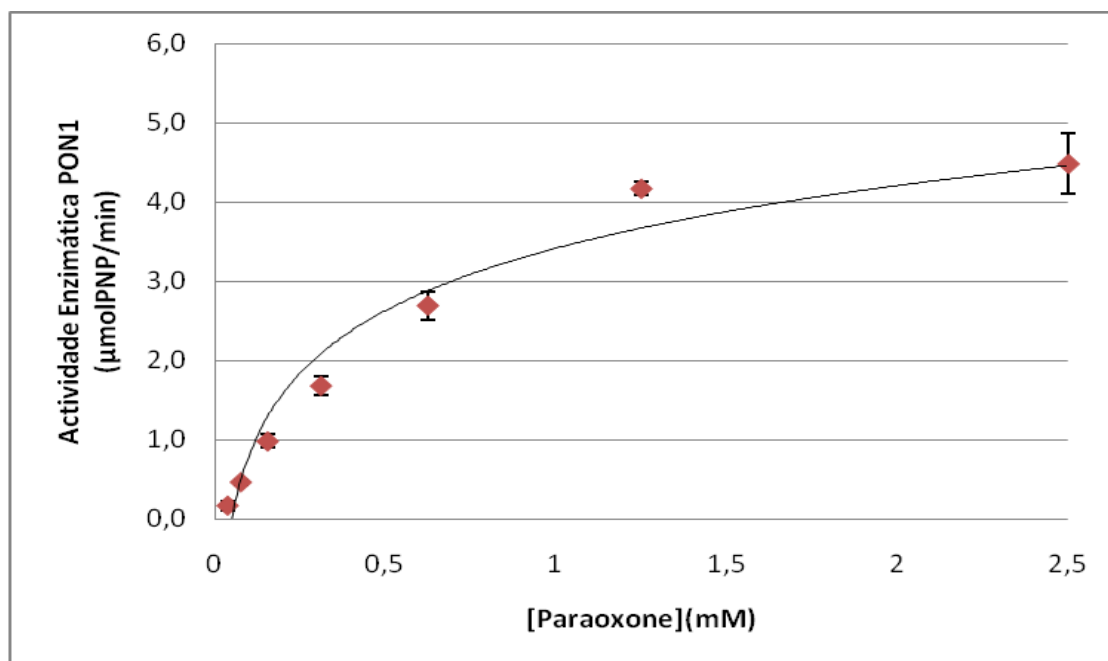


Gráfico I: Representação da curva hiperbólica dada pela actividade enzimática da PON1 em função da concentração de paraoxonee.

Com base nos resultados obtidos, optou-se pela concentração de paraoxonee de 2,5mM, que se justifica por:

- Ser utilizada em estudos anteriores^{91;93;112;113}
- Abs > 1,000 para concentrações superiores
- Linearidade até 2 minutos.

3.3.1.2.3. Determinação do volume de soro a utilizar

A determinação do volume de soro a utilizar teve como objectivo verificar a quantidade mínima necessária do enzima para que a reacção cumpra as condições de cinética de saturação, dado o limitado volume de soro disponível.

Foram colhidas três amostras de sangue de três doadores saudáveis, tendo-se variado o volume de soro entre 20 μ L e 200 μ L, mantendo todas as outras variáveis constantes, e seguindo as condições já optimizadas e anteriormente descritas. O Gráfico II apresenta a curva obtida, tendo em conta o modelo de Michaelis-Menten.

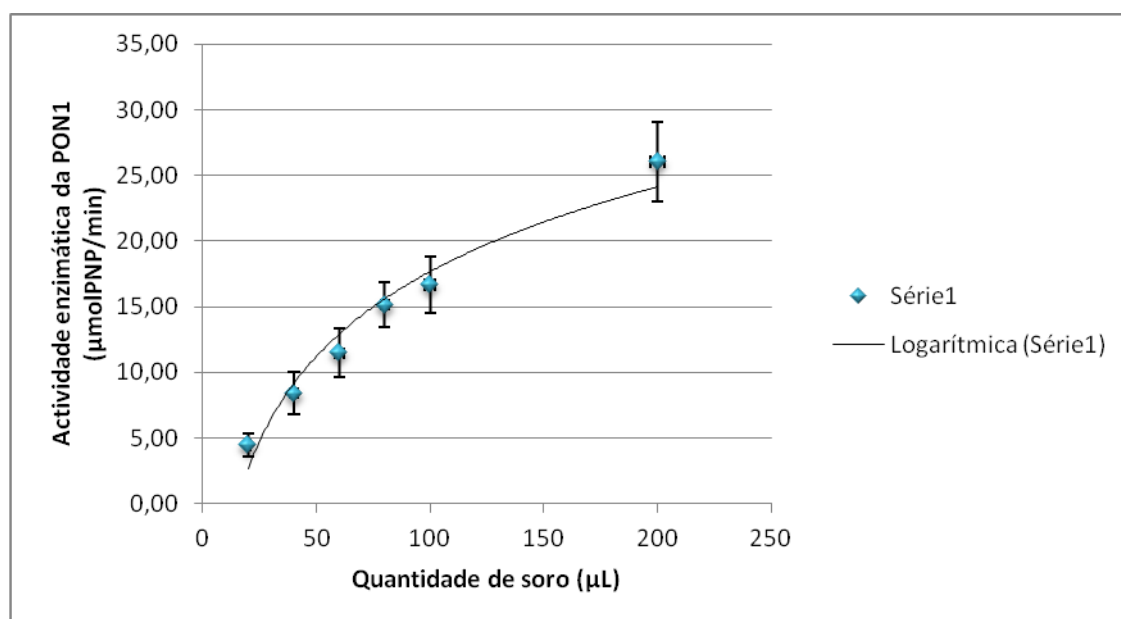


Gráfico II: Representação da Curva de Michaelis-Menten obtida para a actividade enzimática da PON1 em função da quantidade de soro.

Com base nos valores do Gráfico II, optou-se por utilizar em todos os ensaios futuros um volume de soro de 80 μ L, devido a:

- Este volume apresentar uma sensibilidade adequada com a menor percentagem de variação;
- Volumes inferiores não apresentarem sensibilidade;
- Volumes superiores não serem viáveis por limitação da quantidade de soro disponível.

3.3.1.2.4. Determinação das condições de armazenamento do soro a utilizar

Por razões de ordem logística, surgiu a possibilidade do acesso ao sangue ser no dia seguinte ao da sua colheita, pelo que se estudou a variação da actividade da PON1 sérica em diferentes condições de armazenamento do soro, após vários períodos de tempo de obtenção do soro, e sendo este armazenado em condições diferentes, de acordo com o esquema apresentado na Figura 8.

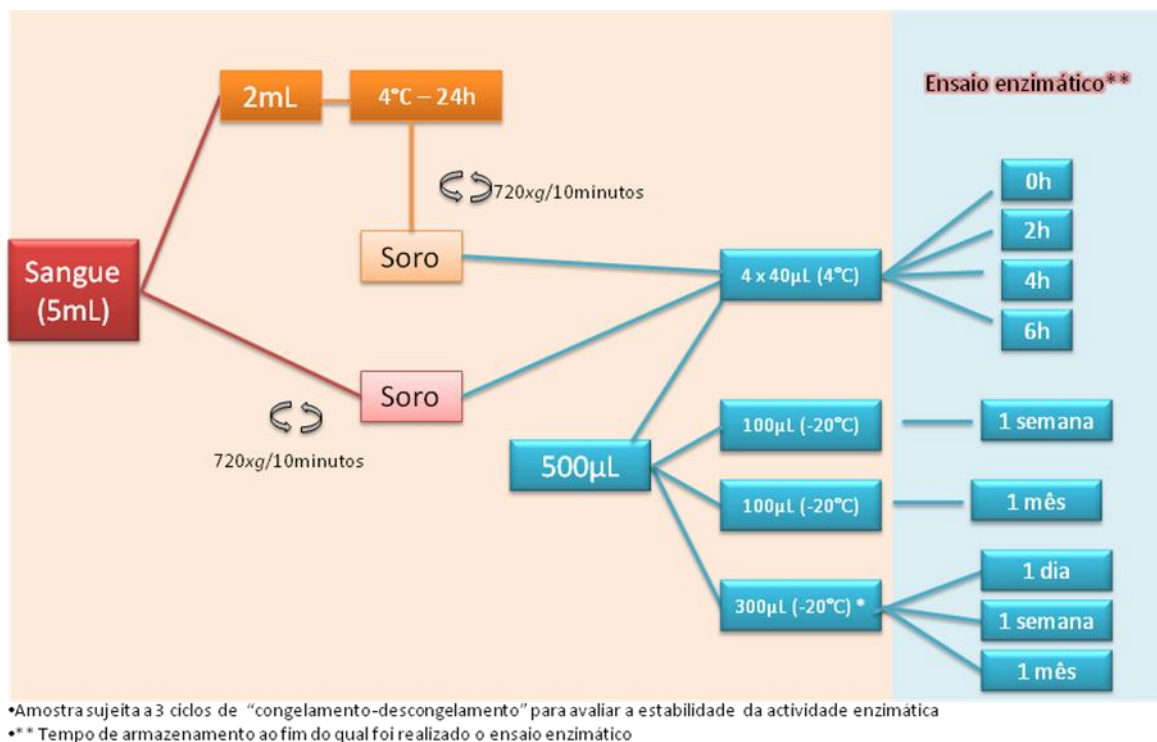


Figura 8: Processo de determinação das condições de armazenamento das amostras de soro para a determinação da actividade enzimática da PON1.

Foram colhidas três amostras de sangue de três dadores saudáveis. Após a colheita do sangue, este foi dividido em dois tubos, um utilizado imediatamente para a obtenção do soro e o outro armazenado a 4°C durante 24h, após o que se obteve o soro. O soro obtido foi dividido em quatro alíquotas de 40µL, duas de 100µL e uma de 300µL, sendo as de 100µL e a de 300µL armazenadas a -20°C. Para as alíquotas de 40µL o ensaio enzimático foi realizado no mesmo dia com os seguintes tempos: 0h, 2h, 4h e 6h após a obtenção do soro. As alíquotas de 100µL foram descongeladas 1 semana e 1 mês depois do congelamento, respectivamente, para realização do ensaio enzimático. A alíquota de 300µL sofreu 3 ciclos de congelamento-descongelamento: 1 dia, 1 semana e 1 mês depois do congelamento inicial. O objectivo deste processo foi verificar se a actividade da PON1 sérica variava em função do tempo e das condições de armazenamento.

Verificou-se que não havia diferenças significativas na actividade da PON1 determinada entre 0h e 24h após o soro ser obtido, desde que armazenado a 4°C. Porém, verificou-se uma acentuada diminuição da actividade em todos os ensaios da actividade enzimática não só com o aumento do tempo em que o soro permanecia a -20°C como também nos ciclos de congelamento-descongelamento do mesmo.

Assim, estabeleceu-se que o soro seria obtido imediatamente após recebido, poucas horas após o sangue ser colhido, e que a determinação da actividade enzimática seria realizadas nas 24h subsequentes, estando o soro armazenado a 4°C.

3.4. Análises laboratoriais

A todos os indivíduos incluídos no estudo foram avaliados os seguintes parâmetros: insulinémia, glicémia, Hemoglobina A1c, parâmetros de função renal (creatininemia, albuminúria), colesterol-HDL, colesterol-LDL e triglicéridos. Estes parâmetros foram determinados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Professor Doutor Fernando da Fonseca, EPE.

3.5. Parâmetros de segurança

Parâmetros padrão de segurança ocular: Biomicroscopia e exame externo do olho, melhor acuidade visual corrigida (MAVC), pressão intra-ocular (PIO), fundoscopia ocular e OCT (tomografia ocular computadorizada). Todos estes parâmetros foram avaliados no Serviço de Oftalmologia do Hospital Professor Doutor Fernando da Fonseca, EPE.

3.6. Análise estatística

Todos os parâmetros foram analisados quanto à normalidade da sua distribuição usando o teste de Shapiro-Wilk. Foram utilizados métodos de análise estatística paramétricos sempre que possível. Nos casos em que não foi possível utilizar métodos paramétricos, os dados foram analisados utilizando métodos estatísticos não paramétricos. A análise de variáveis contínuas de acordo com duas categorias foi feita utilizando um *t-test* desemparelhado ou emparelhado, conforme apropriado. A análise de variáveis contínuas de acordo com mais de duas categorias foi feita utilizando um ANOVA ou um ANCOVA, utilizando os valores basais como co-covariáveis, conforme apropriado, seguido de *post-hoc* Sidak no caso de significância estatística. As variáveis nominais foram analisadas utilizando um teste chi-quadrado ou Fisher's *exact test*, e a correção de Bonferroni foi usada sempre que necessário. As correlações entre parâmetros nominais e ordinais foram avaliadas utilizando os testes *Kendall's τ -b* e *Spearman's ρ* . As correlações entre parâmetros contínuos foram avaliadas utilizando o teste de *Pearson*. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Neste capítulo dar-se-á a apresentação de resultados obtidos a partir da avaliação clínica da população de diabéticos com RD, assim como o estudo dos polimorfismos desta população e da população controlo.

1. Dados demográficos

O estudo contemplou 129 indivíduos, dos quais 86 (66,7%) eram diabéticos, com ou sem RD, e 43 (33,3%) correspondiam à população controlo. A população controlo apresentou homogeneidade entre os sexos (59% masculinos e 41% femininos) e idade média de $38,7 \pm 11,9$ anos. Dos 86 indivíduos diabéticos incluídos no estudo, não foi possível obter os dados clínicos de 39 (45,4%). Os indivíduos constituintes deste grupo foram maioritariamente homens (76,4%), com idade superior a 60 anos. Os 47 (54,7%) indivíduos com caracterização clínica, à semelhança do outro grupo de diabéticos, eram uma população caucasiana, com um número de homens semelhante (51,1%) ao número de mulheres, sendo a idade média em ambos os sexos de $67 \pm 9,0$ anos.

2. Caracterização Clínica dos diabéticos do Hospital Fernando da Fonseca (HFF)

Esta amostra populacional foi constituída por doentes provenientes da consulta externa de oftalmologia do HFF. A seleção foi feita aleatoriamente, podendo esses indivíduos com DM2 apresentarem ou não RD. A Tabela 3 apresenta os resultados da avaliação de parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos

destes doentes, que podem ser determinantes no risco para o desenvolvimento das complicações micro- e macrovasculares da DM2.

Tabela 3: Características dos pacientes com diabetes tipo 2 (DM2).

	média ± SD
n	47
Sexo F (%)	48,9%
Idade (anos)	67±9,0
Tempo de DM (meses)	215,72±119,00
IMC (kg/m²)	29,33±4,00
HbA1c (%)	7,53±1,58
Insulinemia (μU/mL)	12,34±12,47
Glicemia (mg/dL)	161,41±59,06
Col total (mg/dL)	189,04±48,28
Col HDL (mg/dL)	45,59±14,29
Triglicéridos (mg/dL)	164,96±91,06
Creatinemia (mg/dL)	1,07±0,41

IMC – índice de massa corporal; HbA1c – hemoglobina glicada; Coltotal – colesterol total;

ColHDL – lipoproteínas de alta densidade

2.1. Análise da amostra populacional do Hospital Fernando da Fonseca, estratificados pela presença ou ausência de Retinopatia Diabética

Dos 47 indivíduos diabéticos estudados, 17 (36,2%) não apresentavam RD, sendo que a RD foi diagnosticada em 63,8% dos indivíduos. Apenas o tempo de diagnóstico da DM2 se apresentou significativamente superior nos diabéticos com RD quando comparados com os diabéticos sem RD –

Tabela 4. Conforme o seu estágio, foram encontrados 18 (60,0%) casos de RDNP e 12 (40,0%) casos com RDP entre os indivíduos com RD. Apesar de não serem significativos, os resultados obtidos a partir da classificação da RD – ligeira, moderada ou grave – mostraram que o único caso grave encontrado apresentava RDP.

Tabela 4: Características dos pacientes com diabetes tipo 2 (DM2), estratificados pela presença ou ausência de retinopatia diabética (RD).

	Sem RD	Com RD
	média ± SD	
n (%)	17 (36,2%)	30 (63,8%)
Sexo F (%)	9 (39,1%)	14 (60,9%)
Idade (anos)	68,24±10,90	66,86±7,79
Tempo de DM (meses)	147,00±85,49*	246,26±120,28*
IMC (kg/m ²)	30,01±3,71	29,02±4,14
HbA1c (%)	7,38±1,86	7,62±1,42
Insulinemia (μU/mL)	10,44±5,49	13,36±14,94
Glicemia (mg/dL)	156,31±67,52	164,13±55,07
Col total (mg/dL)	188,38±38,37	189,41±53,60
Col HDL (mg/dL)	42,75±12,11	47,10±15,31
Triglicéridos (mg/dL)	187,69±79,12	152,83±95,87
Creatinemia (mg/dL)	1,09±0,55	1,07±0,32

* $p < 0,05$.

IMC – índice de massa corporal; HbA1c – hemoglobina glicada; Coltotal – colesterol total;

ColHDL – lipoproteínas de alta densidade

2.2. Análise da amostra populacional do Hospital Fernando da Fonseca, estratificados pela presença ou ausência de Edema Macular

Tendo em conta que dentre os indivíduos diabéticos apenas 1 dos que apresentavam edema macular não tinha RD (Gráfico III), sendo a associação entre a RD e o EMD estatisticamente significativa ($p < 0,001$), a análise dos parâmetros clínicos neste subcapítulo é realizada considerando os indivíduos sem e com RD, sendo estes últimos estratificados pela presença ou ausência de EMD.

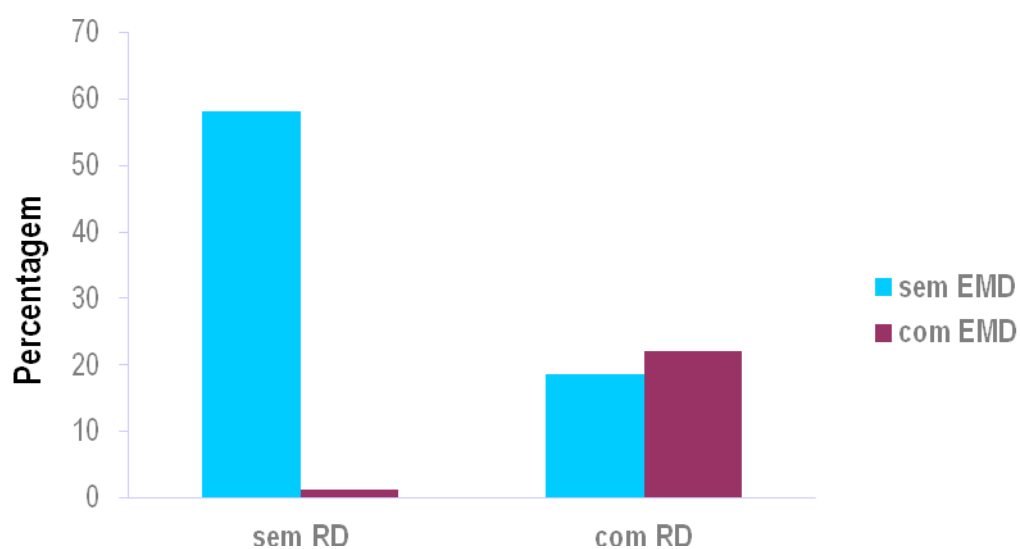


Gráfico III: A ocorrência da RD e do EMD na população de diabéticos estudados. Valores expressos em percentagem. $p < 0,001$.

Dos 30 indivíduos com RD, 11 (36,7%) não apresentaram EMD, sendo que a EMD foi diagnosticada em 63,3% destes pacientes. Os únicos parâmetros com significância estatística ($p<0,05$) encontrados após a estratificação foram o tempo de diagnóstico da DM2 e os valores de glicemia, sendo o primeiro superior nos diabéticos com RD sem EMD quando comparados com os diabéticos sem RD, e o segundo superior nos diabéticos com RD sem EMD quando comparados com os diabéticos com RD mas com EMD – Tabela 5.

Tabela 5: Características dos pacientes com diabetes tipo 2 (DM2), com e sem retinopatia diabética (RD), estratificados pela presença ou ausência de edema macular (EMD).

	Sem RD	RD	
		com EMD	sem EMD
n (%)	17 (36,2%)	19 (40,4%)	11 (23,4%)
Sexo F (%)	9 (39,1%)	9 (39,1%)	5 (21,7%)
Idade (anos)	68,24±10,90	68,72±7,52	69,19±10,65
Tempo de DM (meses)	147,00±85,49*	234,41±112,00	266,40±137,03*
IMC (kg/m²)	30,01±3,71	29,38±3,92	28,36±4,65
HbA1c (%)	7,38±1,86	7,24±1,21	8,26±1,58
Insulinemia (μU/mL)	10,44±5,49	11,06±7,55	17,51±23,06
Glicemia (mg/dL)	156,31±67,52	145,63±43,15*	196,09±60,57*
Col total (mg/dL)	188,38±38,37	178,94±40,63	206,55±68,69
Col HDL (mg/dL)	42,75±12,11	46,00±12,28	49,00±20,05
Triglicéridos (mg/dL)	187,69±79,12	137,42±78,65	179,45±119,54
Creatinemia (mg/dL)	1,09±0,55	1,05±0,27	1,08±0,40

Os dados referem-se à média ± SD ou percentagem (%).IMC – índice de massa corporal; HbA1c – hemoglobina glicada; Coltotal – colesterol total; ColHDL – lipoproteínas de alta densidade; * $p<0,05$.

2.3. Análise de alguns factores de risco para a ocorrência das complicações microvasculares da DM2

Tendo em conta a presença ou ausência de HTA, dislipidémia e patologia cardiovascular (CVD), alguns dos factores de risco conhecidos para as complicações microvasculares da DM2, fez-se a análise destes factores de risco nos indivíduos com DM2, tendo em conta a presença ou ausência de RD (Gráfico IV) ou de EMD (Gráfico V). Apenas a dislipidémia apresentou uma associação significativa com a RD. Para o EMD não foi observada qualquer diferença estatística.

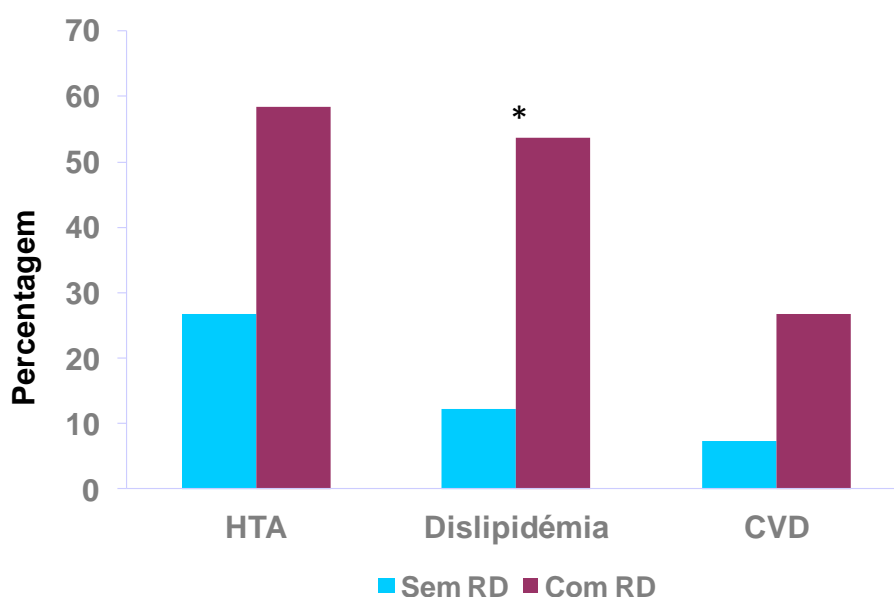


Gráfico IV: Factores de risco para o desenvolvimento de comorbilidades da DM2 nos indivíduos com RD (valores expressos em percentagem). * $p < 0,05$.

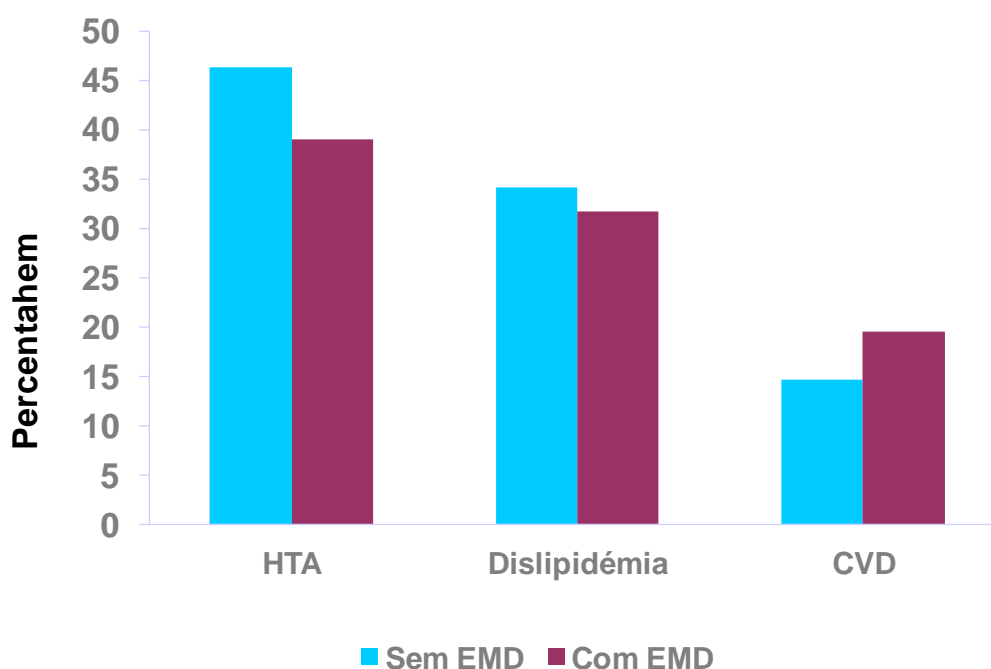


Gráfico V: Factores de risco para o desenvolvimento de comorbilidades na DM2 nos indivíduos com EMD (valores expressos em percentagem). $p > 0,05$.

Na amostra avaliada foi encontrada uma associação entre a dislipidemia e a HTA, sugerindo que ambas as condições patológicas possam estar relacionadas ($p=0,013$). Embora não sendo significativo, adiciona-se a isso os valores encontrados para o colesterol total, que aumentam à medida que evoluem as complicações da diabetes, de ausência de RD a RDP. Observou-se ainda que nos indivíduos com dislipidemia a idade ($69,22 \pm 7,44$ anos, $p=0,042$) e o tempo de diagnóstico da DM2 em meses ($248,81 \pm 125,6$ meses, $p=0,003$) é significativamente superior, quando comparados com os aqueles sem essa condição patológica.

No grupo dos diabéticos avaliados, o valor médio do IMC revelou-se significativamente superior ($31,48 \pm 3,8 \text{ kg/m}^2$) naqueles que apresentaram doenças cardiovasculares comparativamente aos que nunca apresentaram qualquer evento cardiovascular ($28,00 \pm 3,57 \text{ kg/m}^2$). Outra situação patológica avaliada tendo em conta a presença da DM2 foi a nefropatia diabética, a qual não apresentou qualquer diferença significativa.

Relativamente à presença de fumadores e não fumadores na população, observou-se que 15% têm ou tiveram hábitos tabágicos, sendo os valores de glicémia, colesterol total e triglicéridos desses indivíduos mais elevados comparativamente aos não fumadores – $214,33 \pm 84,48 \text{ mg/dL}$ vs $150,79 \pm 51,078 \text{ mg/dL}$, $p=0,015$; $253,5 \pm 50,31 \text{ mg/dL}$ vs $175,64 \pm 35,6 \text{ mg/dL}$, $p<0,001$; e $253 \pm 122,86 \text{ mg/dL}$ vs $146,8 \pm 83,94 \text{ mg/dL}$, $p=0,011$, respectivamente.

3. Influência dos polimorfismos genéticos do VEGF, RAGE, PON1 e PON2 na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2 e sua evolução para Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético

Os polimorfismos foram avaliados tendo em conta o grupo de doentes entre si e comparados com o grupo controlo. As distribuições genotípicas e alélicas para cada um dos polimorfismos foram calculadas tendo em conta o grupo controlo, o grupo dos diabéticos com e sem RD ou com e sem EMD, e o grupo de diabéticos com RD com e sem EMD.

A população do estudo está em equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação aos polimorfismos estudados.

3.1. Influência do polimorfismo genético VEGF -634G/C na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético

Não se obteve qualquer diferença estatística entre a distribuição genotípica ou alélica na população controlo comparada com a população de diabéticos, entre o grupo dos diabéticos com e sem RD ou com e sem EMD, e entre o grupo de diabéticos com RD com e sem EMD (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição de genótipos e alelos do polimorfismo do VEGF -634G/C, em controlos e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD.

	VEGF -634 (GG)	VEGF -634 (GC)	VEGF -634 (CC)	Alelo G	Alelo C
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Controlos	17 (39,5)	18 (41,9)	8 (18,6)	0,605	0,395
DM2	29 (33,7)	44 (51,2)	13 (15,1)	0,593	0,407
RD	11 (31,4)	18 (51,4)	6 (17,1)	0,571	0,429
Sem RD	18 (35,3)	26 (51,0)	7 (13,7)	0,608	0,392
EMD	7 (35,0)	11 (55,0)	2 (10,0)	0,625	0,375
Sem EMD	22 (33,3)	33 (50,0)	11 (16,7)	0,583	0,417
RD sem EMD	3 (27,3)	5 (45,5)	3 (27,3)	0,500	0,500
RD com EMD	7 (36,8)	10 (52,6)	2 (10,5)	0,632	0,368

A falta de significado estatístico permaneceu mesmo após o agrupamento dos genótipos, conforme apresenta o Tabela 7. O agrupamento foi feito segundo Nakamura et al²⁵.

Tabela 7: Distribuição de genótipos do polimorfismo do VEGF -634G/C, em controles e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD, após agrupamento.

	VEGF -634 (GG)	VEGF -634 (GC+CC)
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Controlos	17 (39,5)	26 (60,5)
DM2	29 (33,7)	57 (66,3)
RD	11 (31,4)	24 (68,6)
Sem RD	18 (35,3)	33 (64,7)
EMD	7 (35,0)	13 (65,0)
Sem EMD	22 (33,3)	44 (66,7)
RD sem EMD	3 (27,3)	8 (72,7)
RD com EDM	7 (36,8)	12 (63,2)

3.2. Influência do polimorfismo genético RAGE -374A/T na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético

Os resultados obtidos para o polimorfismo do RAGE encontram-se apresentados no Tabela 8. Verificou-se que houve diferenças significativas na distribuição genotípica entre diabéticos com e sem RD e entre diabéticos com e sem EMD.

Tabela 8: Distribuição de genótipos e alelos do polimorfismo do RAGE -374A/T, em controles e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD.

	RAGE-374 (AA)	RAGE-374 (AT)	RAGE-374 (TT)	Alelo A	Alelo T
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)		
Controles	11 (26,2)	10 (23,8)	21 (50,0)	0,381	0,619
DM2	22 (25,6)	31 (36,0)	33 (38,4)	0,436	0,564
RD	4 (11,4) ^a	10 (28,6) ^a	21 (60,0) ^a	0,257	0,743
Sem RD	18 (35,3) ^a	21 (41,2) ^a	12 (23,5) ^a	0,559	0,441
EMD	2 (10,0) ^b	5 (25,0) ^b	13 (65,0) ^b	0,225	0,775
Sem EMD	20 (30,3) ^b	26 (39,4) ^b	20 (30,3) ^b	0,500	0,500
RD sem EMD	2 (12,5)	5 (31,3)	9 (56,3)	0,281	0,719
RD com EMD	2 (10,5)	5 (26,3)	12 (63,2)	0,237	0,763

^a $p=0,002$; ^b $p=0,013$.

Com o agrupamento dos genótipos AA+AT, verificou-se que o alelo A foi mais frequente na ausência de RD, comparada com a presença de RD, e também na ausência de EMD comparada com a presença desta patologia (Tabela 9).

Tabela 9: Distribuição de genótipos do polimorfismo do RAGE -374A/T, em controlos e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD, após agrupamento.

	RAGE -374 (AA+AT)	RAGE -374 (TT)
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Controlos	21 (50,0)	21 (50,0)
DM2	53 (61,6)	33 (38,4)
RD	14 (40,0) ^a	21 (60,0) ^a
Sem RD	39 (76,5) ^a	12 (23,5) ^a
EMD	7 (35,0) ^b	13 (65,0) ^b
Sem EMD	46 (69,7) ^b	20 (30,3) ^b
RD sem EMD	7 (43,8)	9 (56,3)
RD com EMD	7 (36,8)	12 (63,2)

^a*p*=0,001; ^b*p*=0,008.

A análise do odds-ratio (OR) mostrou que o alelo A é factor protector para o aparecimento da RD e do EMD, conforme apresenta o Tabela 10.

Tabela 10: Risco relativo para a associação entre o alelo A do polimorfismo do RAGE -374A/T, em indivíduos com ou sem RD ou com e sem EMD.

	OR	IC (95%)	Valor <i>p</i>
Sem RD vs com RD	0,392	0,223 – 0,689	0,001
Sem EMD vs com EMD	0,466	0,286 – 0,759	0,008

3.3. Influência do polimorfismo genético PON1 *Gln192Arg* na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético

O Tabela 11 apresenta os resultados obtidos das distribuições genóticas e alélicas do polimorfismo da PON1 (Arg=alelo Q; Gln=alelo R). Foram encontradas diferenças significativas entre indivíduos com DM2 e o grupo controle.

Tabela 11: Distribuição de genótipos e alelos do polimorfismo do PON1 *Gln192Arg*, em controles e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD.

	PON1 (QQ)	PON1 (QR)	PON1 (RR)	Alelo Q	Alelo R
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)		
Controlos	30 (69,8) ^a	6 (14,0) ^a	7 (16,3) ^a	0,767	0,233
DM2	61 (70,9) ^a	22 (25,6) ^a	3 (3,5) ^a	0,837	0,163
RD	23 (65,7)	11 (31,4)	1 (2,9)	0,814	0,186
Sem RD	38 (74,5)	11 (21,6)	2 (3,9)	0,853	0,147
EMD	13 (65,0)	6 (30,0)	1 (5,0)	0,800	0,200
Sem EMD	48 (72,7)	16 (24,2)	2 (3,0)	0,848	0,152
RD sem EMD	11 (68,8)	5 (31,3)	0 (0,0)	0,844	0,156
RD com EMD	12 (63,2)	6 (31,6)	1 (5,3)	0,789	0,211

^a $p=0,022$.

Os resultados obtidos após agrupamento dos genótipos QQ+QR mostrou que os genótipos QQ+QR foram mais frequentes nos diabéticos comparados com os controlos (Tabela 12).

Tabela 12: Distribuição de genótipos do polimorfismo do PON1 Gln192Arg, em controlos e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD, após agrupamento.

	PON1 Gln192Arg (QQ+QR)	PON1 Gln192Arg (RR)
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Controlos	36 (83,7) ^a	7 (16,3) ^a
DM2	83 (96,5) ^a	3 (3,5) ^a
RD	34 (97,1)	1 (2,9)
Sem RD	49 (96,1)	2 (3,9)
EMD	19 (95,0)	1 (5,0)
Sem EMD	64 (97,0)	2 (3,0)
RD sem EMD	16 (100,0)	0 (0,0)
RD com EDM	8 (94,7)	1 (5,3)

^a $p=0,016$.

A análise do odds-ratio (OR) mostrou que o alelo Q é factor de risco para o aparecimento da DM2, conforme apresenta o Tabela 13.

Tabela 13: Risco relativo para a associação entre o alelo Q do polimorfismo PON1 Gln192Arg, em indivíduos com DM2 comparados com controlos.

	OR	IC (95%)	Valor <i>p</i>
DM2 vs controlos	4,667	1,269 – 17,158	0,016

3.4. Influência do polimorfismo genético PON2 Cys310Ser na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético

Os resultados obtidos para as distribuições genótípicas e alélicas do polimorfismo PON2 Cys310Ser encontram-se apresentados no Tabela 14 (Ser=alelo S; Cys=alelo C). Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ao comparar o grupo com DM2 e os indivíduos saudáveis.

Tabela 14: Distribuição de genótipos do polimorfismo do PON2 Cys310Ser, em controlos e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD.

	PON2 (SS)	PON2 (SC)	PON2 (CC)	Alelo S	Alelo C
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Controlos	14 (32,6) ^a	6 (14,0) ^a	23 (53,5) ^a	0,395	0,605
DM2	36 (41,9) ^a	33 (38,4) ^a	17 (19,8) ^a	0,610	0,390
RD	15 (42,9)	16 (45,7)	4 (11,4)	0,657	0,343
Sem RD	21 (41,2)	17 (33,3)	13 (25,5)	0,578	0,422
EMD	8 (40,0)	11 (55,0)	1 (5,0)	0,675	0,325
Sem EMD	28 (42,4)	22 (33,3)	16 (24,2)	0,591	0,409
RD sem EMD	7 (43,8)	6 (37,5)	3 (18,8)	0,625	0,375
RD com EDM	8 (42,1)	10 (52,6)	1 (5,3)	0,684	0,316

^a $p < 0,001$.

Os resultados obtidos após agrupamento dos genótipos SS+SC mostrou que o alelo S foi mais frequente nos diabéticos comparados com os controlos (Tabela 15).

Tabela 15: Distribuição de genótipos do polimorfismo do PON2 Cys310Ser, em controlos e indivíduos com DM2, RD ou EMD, e indivíduos com RD com e sem EMD, após agrupamento.

	PON2 Cys310Ser (SS+SC)	PON2 Cys310Ser (CC)
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Controlos	20 (46,5) ^a	23 (53,5) ^a
DM2	69 (80,2) ^a	17 (19,8) ^a
RD	31 (88,6)	4 (11,4)
Sem RD	38 (74,5)	13 (25,5)
EMD	19 (95,0)	1 (5,0)
Sem EMD	50 (75,8)	16 (24,2)
RD sem EMD	13 (81,3)	3 (18,8)
RD com EDM	18 (94,7)	1 (5,3)

^a $p < 0,001$.

A análise do odds-ratio (OR) mostrou que o alelo S é factor de risco para o aparecimento da DM2, conforme apresenta o Tabela 16.

Tabela 16: Risco relativo para a associação entre o alelo S do polimorfismo PON2 Cys310Ser, em indivíduos com DM2 comparados com controlos.

	OR	IC (95%)	Valor <i>p</i>
DM2 vs controlos	2,706	1,627 – 4,501	< 0,001

3.5. Influência da actividade enzimática da PON1 na Diabetes Mellitus tipo 2 e suas complicações microvasculares

Os resultados encontrados para a actividade enzimática da PON1, consoante os grupos analisados e de acordo com os genótipos da PON1 encontram-se representados pelas Gráficos VI e VII. Não se verificaram quaisquer diferenças estatísticas em nenhuma situação.

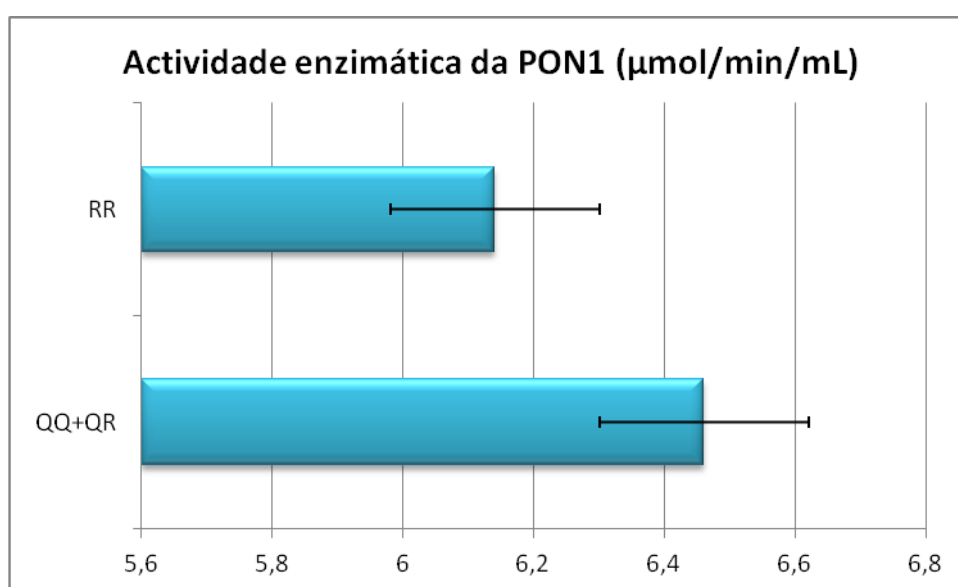


Gráfico VI: Actividade enzimática da PON1 ($\mu\text{mol/min/mL}$) de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1 *Gln192Arg* em indivíduos diabéticos tipo 2 (valores expressos em média \pm SD).

$p > 0,05$.

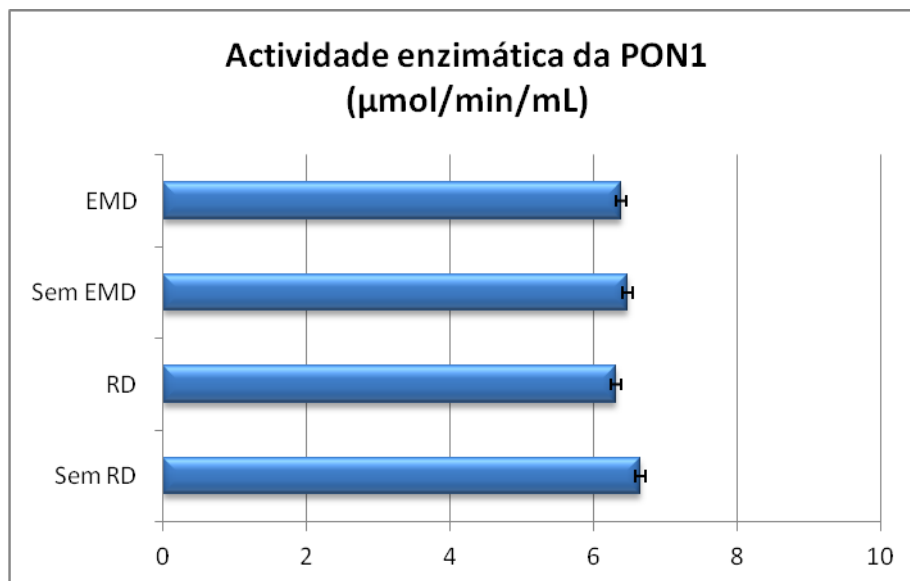


Gráfico VII: Actividade enzimática da PON1 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) em indivíduos diabéticos tipo 2 com presença ou ausência de RD ou de EMD (valores expressos em média \pm SD). $p > 0,05$.

DISCUSSÃO

Em consequência da epidemia mundial da DM2, à qual se assiste, espera-se que em alguns anos haja um surto semelhante das complicações diabéticas. Considerando que das complicações decorrentes da DM2, a RD é das mais comuns, espera-se que tendencialmente esta comorbilidade aumente^{122;123}. Em vários países, essencialmente os do mundo ocidental, a RD é não só a causa mais prevalente de cegueira entre indivíduos em idade activa (20 – 65 anos), como também a causa mais frequente da perda de visão entre a população idosa^{124;125}. A sua prevalência nestes mesmos países ronda os 40% dos diabéticos, para a população caucasiana¹²⁶⁻¹²⁸, estimativa esta que está de acordo com os resultados do presente estudo. Salienta-se que não foi encontrado nenhum caso de perda da visão embora a idade média destes pacientes fosse acima dos 65 anos. Este resultado seria de esperar considerando que a maioria dos indivíduos se encontrava na fase não proliferativa da RD, a qual é caracterizada pela ausência da neovascularização na retina ou no disco óptico¹²⁶. Inúmeros estudos têm apontado o tempo da DM2 como um dos principais factores de risco para o aparecimento da RD¹²⁹⁻¹³¹, o que os nossos resultados comprovam. De facto, o tempo de diagnóstico da DM2 é considerado como um factor de risco de grande relevância na RD, o que enfatiza a influência directa que a prevenção primária da DM2, um diagnóstico atempado e correcto, e uma abordagem terapêutica adequada podem exercer na prevalência e severidade desta comorbilidade^{128;132}.

Dada a prevalência obtida de EMD no presente estudo, comprova-se uma forte associação entre a existência do EMD e RD, podendo esta última condicionar o aparecimento do EMD. Praticamente todos os indivíduos com EMD encontrados no estudo apresentavam RD. Outros autores têm encontrado prevalências de aproximadamente 7,0% de EMD em diabéticos com RD^{126;128;133}. O EMD pode

aparecer em qualquer fase da RD, embora seja mais incidente na RDP, e há quem defenda que 25% dos diabéticos apresenta EMD¹³⁴. Considera-se que a prevalência de EMD seja de um décimo na RDNP e de um terço na RDP^{135;136}. Estando a RD e o EMD presentes, existem riscos acrescidos de complicações macrovasculares, e tanto a RD como o EMD são consequência de uma progressiva e incontrolada DM2¹³⁶. De facto, os nossos resultados revelaram uma relação significativa entre a glicémia e o EMD, na presença da RD, mas com os níveis de glicémia a apresentarem-se mais baixos na presença de EMD. Sugerimos que tal se deva ao mais rigoroso controlo glicémico a que esses pacientes se encontram sujeitos. Esta hipótese é suportada pelos valores ligeiramente mais baixos de HbA1c (%) encontrados nestes pacientes, embora sem atingir a significância estatística, quando comparados com os valores de HbA1c dos pacientes sem EMD ($p = 0.069$). Por outro lado, embora resultados recentes revelem que os níveis da HbA1c aumentam com a gravidade da RD¹³⁷, é importante lembrar que o controlo glicémico rigoroso reduz ou atrasa significativamente a progressão da RD^{136;137}. De enfatizar que a maioria dos diabéticos do estudo apresentava RDNP, o que pode justificar os níveis de glicémia mais baixos, ou uma glicémia mais controlada, assim como a inexistência de casos de cegueira no grupo avaliado.

Dentre os vários factores de risco conhecidos para as complicações microvasculares da DM2, a HTA é considerada um dos principais factores de risco modificáveis para a RD¹³⁷. Por cada 10mmHg de aumento na pressão arterial, aumenta em 10% o risco para o desenvolvimento precoce da RD, e em 15% o risco para a RDP ou EMD¹³⁸. Embora os resultados encontrados não tenham sido significativos, parece existir uma tendência para os diabéticos hipertensos possuírem maiores riscos de evoluírem para um quadro de RD. Está descrito que com um rigoroso controlo da pressão arterial é possível reduzir em 34% o risco para a RD, assim como a redução de 47% na perda da acuidade visual, em indivíduos com DM2¹³⁷. Subsequentes à HTA, as DCV aparecem tendencialmente relacionadas com a RD e EMD. Estas duas complicações microvasculares da DM2 exercem influência na incidência de

eventos cardiovasculares. Estimativas ajustadas mostram um risco 2,5 vezes maior de enfarte do miocárdio e um risco duas vezes maior de AVC em pacientes com EMD, em comparação com pacientes diabéticos sem distúrbios da retina¹³⁹. Do mesmo modo, estudos indicam que a RD é um factor predictivo da mortalidade e morbilidade cardiovascular¹⁴⁰. De facto, os nossos resultados mostraram uma associação entre a ocorrência de doenças cardiovasculares e valores mais elevados de IMC, que denotam obesidade moderada, de acordo com a classificação da OMS¹⁴¹. Sendo de consenso comum que a obesidade é uma condição associada à DM2¹⁴², e um dos factores *major* que desencadeia doenças cardiovasculares, a associação por nós encontrada entre o IMC e as doenças cardiovasculares confirma que esta relação também existe na nossa amostra populacional.

A DM2 é frequentemente associada à presença de dislipidémia, a qual se caracteriza por níveis elevados de colesterol total, LDL, e triglicéridos, e diminuição dos níveis de HDL¹⁴³. Os nossos resultados mostraram uma associação estatisticamente significativa entre a dislipidémia e a RD, o que comprova a associação entre elevados níveis lipídicos séricos (triglicéridos, colesterol total, LDL) e o aumento de exsudatos duros presentes na retina de indivíduos com RD, encontrado pelo estudo ETDRS²³. Este estudo retrospectivo avaliou a relação entre os níveis lipídicos e a presença de exsudatos duros na retina e na acuidade visual de diabéticos com RD, tendo os autores concluído que níveis baixos de lípidos no soro podem diminuir o risco para a formação desses exsudatos duros, associados à perda de visão nos pacientes diabéticos.

O uso do tabaco surge como uma agravante nos casos de DM2, exacerbando o estado hiperglicémico e de dislipidémia desses indivíduos, contribuindo como factor de risco para as complicações microvasculares na DM2³¹. Os nossos resultados confirmam esta associação, tendo os fumadores ou ex-fumadores apresentado valores da glicémia, colesterol total e triglicéridos mais elevados do que os não fumadores, embora não se tenha verificado uma associação directa entre o consumo tabágico e a RD.

Em suma, os nossos dados sugerem a dislipidemia como sendo um factor de risco para a RD, sendo ainda um provável factor de risco para a gravidade desta complicação microvascular da DM2.

Parece haver uma componente genética para o aparecimento, desenvolvimento e progressão da RD, o que é suportado pelas diferenças encontradas na sua prevalência em várias partes do globo, pela severidade com que se apresenta e pelo espaço de tempo em que aparece após ser diagnosticado a DM2. São vários os estudos que comprovam a existência de diferenças étnicas que condicionam a prevalência da RD e que não podem ser explicadas pelo aumento global ou regional da prevalência da DM2^{126;144}, razão pela qual se considera a etnia como um factor de risco para DM2¹⁴⁵. De acordo Sivaprasad et al., os descendentes de Asiáticos e Africanos possuem um risco duas vezes maior de deficiência visual por RD comparados com os caucasianos. Já os Hispânicos diabéticos desenvolvem retinopatia severa precocemente e progride mais rapidamente, comparados com Afro-Americanos ou Europeus Americanos¹²⁸. Do mesmo modo, existem diferenças entre Africanos/Afro-Caribenhos (52,4%) e Sul-Asiáticos (42,3%), comparados com os Europeus (38%), relativamente à prevalência da RD¹²⁸. Hallman et al.¹⁴⁶ relataram a existência de agregação familiar de RD grave em pacientes diabéticos tipo 2, independentemente dos factores de risco clínicos. Inúmeros estudos têm-se dedicado à identificação de SNPs em vários genes, como estando relacionados com o aparecimento ou a susceptibilidade para a RD. No entanto, devido a várias razões de carácter populacional e ambiental, a identificação de genes de susceptibilidade é uma árdua tarefa.

Influência do polimorfismo genético VEGF-634G/C na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético

Sendo um dos principais reguladores, quer fisiológico como patológico, da neovascularização e da permeabilidade vascular, o VEGF desempenha um papel crucial na etiologia da RD¹⁴⁷. O seu

envolvimento na RD tem sido tema de inúmeros estudos, os quais têm demonstrado a existência de elevados níveis de VEGF no vítreo e nos fluídos aquosos, principalmente em olhos de pacientes com RDP^{62;148}.

O gene do VEGF tem sido implicado no desenvolvimento da RD, mas existem discrepâncias nos vários resultados reportados, os quais parecem ser controversos e inconclusivos. Alguns autores apontam o polimorfismo -634G/C como factor de risco genético para a RD^{147;149;150}, enquanto que outros não encontraram nenhuma associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento da RD em diabéticos tipo 2^{62;148;151}.

No presente estudo colocou-se a hipótese de existir associação entre o polimorfismo -634G/C do VEGF e a ocorrência de DM2, RD ou EMD.

Os nossos resultados não mostraram qualquer diferença nas distribuições genotípicas ou alélicas do polimorfismo VEGF-634G/C entre doentes com DM2 e a população controlo, ou, dentre os doentes com DM2, presença ou ausência de RD ou de EMD, pelo que nenhum dos alelos, G ou C, se apresentou como sendo factor de risco para estas patologias.

Estes resultados diferem de outros estudos, que sugerem o importante papel desempenhado pelo VEGF no desenvolvimento das complicações diabéticas, devido às modificações e aceleração do dano tecidual, causado pela hiperglicémia¹⁴⁹ e na qual variações genéticas no gene do VEGF parecem influenciar a sua expressão proteica. Alguns estudos têm sugerido que o alelo C constitui um factor de risco para a RD¹⁵⁰ e para o EMD na população japonesa. De igual modo, o genótipo CC tem sido associado aos níveis aumentados do VEGF no vítreo e no soro. Também numa amostra populacional polaca com DM2, estudada por Szaflik et al⁶⁹, foi observada uma associação entre o alelo C e o desenvolvimento da RDNP. No entanto, e analogamente aos nossos resultados, Ray et al.⁷¹ não

encontraram nenhuma associação deste polimorfismo com a DM2, numa amostra populacional britânica.

Resumindo, os nossos resultados, em conjunto com os reportados por outros autores, reforçam que a associação entre este polimorfismo do VEGF e a presença de DM2, RD ou EMD permanece inconclusiva, tanto em populações da mesma etnia como em etnias diferentes.

Influência do polimorfismo genético RAGE-374A/T na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético

O RAGE é conhecido como um importante mediador inflamatório em doenças como a aterosclerose, o Alzheimer e nas complicações diabéticas. Acredita-se que a interação entre os AGEs e o seu receptor – RAGE – desempenha um importante papel no desenvolvimento e progressão da diabetes, assim como nas complicações microvasculares subjacentes^{55;152;153}. No entanto, é de salientar que apesar de ser reconhecida a sua acumulação na diabetes, os AGEs também se formam em condições de *stress* oxidativo e inflamatórias, mesmo na ausência de hiperglicémia¹⁵⁴. Adicionalmente a outras consequências fisiopatológicas, os AGEs, através do RAGE, podem induzir a expressão de moléculas de adesão inflamatória, que estão sobre-expressas em doenças proliferativas da retina¹⁵⁵. Para além disso, o resultado da interação AGEs-RAGE, que pode desencadear uma activação celular dependente do RAGE, induz *stress* oxidativo e promove uma resposta inflamatória proliferativa, levando à disfunção celular^{50;52;153}. Assim, a inibição da formação de AGEs ou o bloqueio da sinalização do RAGE podem ser alvos promissores para a intervenção terapêutica, como prevenção das complicações vasculares da DM, já sugerido por vários autores, cujos estudos para compreender esses mecanismos se encontram em curso^{156;157}. Por outro lado, variantes no gene do RAGE parecem alterar essa via de

activação, através da alteração da expressão do RAGE, afectando o desenvolvimento das complicações vasculares¹⁵⁸.

Dentre os vários polimorfismos genéticos identificados do RAGE, a variante -374T/A é a que mais fortemente tem sido associada a doenças vasculares⁵⁰. A implicação funcional desta variante foi revelada por ensaios com um gene repórter e com um factor de transcrição de ligação ao RAGE, que revelaram que o alelo -374A levou ao aumento da expressão do gene, assim como à completa anulação da ligação do factor de transcrição *in vitro*^{55;82}. De acordo com Kancova et al.¹⁵⁹ a actividade transcripcional do alelo A aumenta somente em ambiente normoglicémico, comparado com o alelo T, enquanto que não aumenta em condições de hiperglicémia. Após esses resultados despertou-se o interesse em investigar o papel do polimorfismo -374A no risco e no desenvolvimento de doenças vasculares⁸². Relativamente à RD são poucos os estudos que demonstram a sua associação com o polimorfismo RAGE -374A/T, e os já publicados descrevem resultados controversos. De acordo com os nossos resultados, o alelo A constitui um factor de protecção para a RD e EMD, pois foi encontrado com maior frequência entre os indivíduos sem RD e sem EDM. Estes resultados estão de acordo com outros estudos nos quais o alelo A do polimorfismo RAGE -374A/T parece constituir um factor protector para as complicações vasculares da DM^{250;160-162}. No entanto, Petrovic et al.⁷² reportaram uma associação deste alelo com a RDP numa população caucasiana, e Lindholm et al.¹⁶³ encontraram uma maior frequência dos genótipos AA e AT em caucasianos com RD comparados com os sem RD. Apesar de modesta, Ramprasad et al. mostraram a mesma associação em indivíduos indianos com RDNP¹⁶⁴. Num estudo realizado por Zee et al, o alelo A foi apontado como sendo um importante factor de risco para a cegueira em caucasianos com RD¹⁶⁵.

Existe grande controvérsia em relação ao alelo A ser um factor de risco ou de protecção para as complicações vasculares da diabetes, o que pode ser justificado pelas diferenças nas populações

estudadas, nomeadamente critérios de inclusão e exclusão, idade, tempo de diagnóstico da DM2, controlo glicémico e existência de co-morbilidades. Fica evidente que não necessários mais estudos que investiguem o polimorfismo do RAGE -374A/T e a sua influência na DM2, RD e EMD.

Influência dos polimorfismos genéticos PON1 Gln192Arg e PON2 Cys310Ser na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 2, Retinopatia Diabética e Edema Macular Diabético

Da família multigénica da paraoxonase foram avaliados os genes PON1 e PON2, sendo os polimorfismos nas posições 192 e 310 das respectivas proteínas. Foi avaliada a influência de ambos os polimorfismos na DM2, RD e EMD, bem como relacionado o polimorfismo da PON1 com a sua actividade enzimática sérica, e a sua influência nas referidas condições patológicas.

Estudos prévios sugerem que polimorfismos genéticos influenciam os níveis de expressão dos genes da PON e, consequentemente, a sua actividade^{166;167}. Vários estudos populacionais têm reportado diferenças interétnicas nas frequências alélicas dos polimorfismos da PON1 e PON2¹⁶⁸. De acordo com Shin¹⁶⁸ essa variabilidade sugere que diferenças étnicas, interações gene-gene, e a susceptibilidade para factores ambientais podem modular a relação entre os polimorfismos da PON e patologias como a DM2.

O polimorfismo da PON1 Gln192Arg resulta da substituição de uma glutamina (Q) por uma arginina (R) na posição 192 da proteína. Relativamente às frequências alélicas, as encontradas no nosso estudo são semelhantes às encontradas em outros grupos étnicos¹⁶⁹⁻¹⁷¹, sempre com uma maior frequência do alelo Q, independentemente da presença ou ausência de patologia e independentemente da própria patologia. Também de acordo com os nossos resultados, o alelo Q revelou-se factor de risco para o aparecimento da DM2, não apresentando influência na RD ou EMD. Embora os estudos que têm sido

conduzidos para investigar o polimorfismo da PON1 Gln192Arg na RD sejam escassos, Mackness et al.⁹³ também não encontraram qualquer relação entre a presença e ausência de RD e o polimorfismo da PON1 Gln192Arg, embora tenham sugerido que na população com RD a frequência do alelo 192Q tenha sido superior em comparação com os indivíduos que não apresentavam RD. Contrariamente, num outro estudo de Mackness et al.¹⁷², o alelo Q mostrou-se protetor para a aterosclerose. Por sua vez, Laksmi et al.¹⁷³ encontraram uma maior frequência do alelo Q em indivíduos com doença coronária, comparados com indivíduos saudáveis. Corroborando estes resultados, Zama et al.¹⁷⁴ revelaram o alelo Q como factor de risco para a doença coronária.

Concluindo, o presente estudo encontrou uma associação significativa entre a variante 192Gln e a ocorrência da DM2, à semelhança de outras condições patológicas nas quais o *stress* oxidativo exerce uma grande influência, como é o caso das patologias cardiovasculares.

Relativamente ao polimorfismo da PON2Cys310Ser, que se dá na região codificante do gene da PON2, os nossos resultados apontam para o alelo S como factor de risco para o aparecimento da DM2, não apresentando influência na RD ou EMD. Não foi encontrado nenhum estudo que apresentasse este mesmo resultado, sendo assim uma hipótese a ser investigada futuramente. No entanto, Mackness et al.⁹³ reportaram uma tendência para o alelo C ser mais frequente entre indivíduos com RD comparativamente a indivíduos saudáveis.

Influência do polimorfismo genético PON1 Gln192Arg na actividade enzimática sérica da paraoxonase

A actividade enzimática da PON1 depende consideravelmente do genótipo presente e da influência de factores exógenos como a dieta, o consumo tabágico e a utilização de medicamentos controladores dos níveis lipídicos^{167;175}. O polimorfismo PON1 Gln192Arg é o associado à maior diferença registada

na actividade do enzima, em comparação com outros polimorfismos identificados no PON1, com o genótipo homozigótico Arg192Arg (RR) a conferir maior actividade, e a forma Gln192Gln (QQ) com actividade mais baixa¹⁷⁶. Embora influenciando a actividade enzimática da PON1, o polimorfismo PON1 Gln192Arg não afecta a sua concentração proteica¹⁷⁶. No presente estudo não foram encontradas diferenças na actividade enzimática determinada, nem tendo em conta a distribuição genotípica do polimorfismo da PON1, nem quando esta actividade enzimática foi comparada entre indivíduos com e sem RD ou com e sem EMD. Este resultado difere do encontrado por Ikeda et al¹⁷⁰, que investigaram a actividade enzimática da PON e as complicações da DM em diabéticos não-insulino-dependentes, tendo verificado que a actividade da PON aumentava na ordem QQ < QR < RR. Regra geral, os diabéticos possuem níveis mais baixos de PON1, sendo o *stress* oxidativo o maior responsável por esse decréscimo^{170;176}. Sabe-se que a PON1 possui actividade anti-aterogénica, pelo que se especula que a sua baixa actividade, observada em pacientes diabéticos, pode contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose.

O facto de, no presente estudo, os resultados entre os grupos avaliados (com e sem RD e com e sem EMD) não serem estatisticamente diferentes pode ter várias justificações: a) os diferentes estadios da RD nos indivíduos diabéticos; b) a actividade da PON1 ser influenciada por outros factores para além do polimorfismo; c) factores ambientais, como a dieta e o uso do tabaco, não foram considerados na análise da actividade da PON1. Sugere-se que, em estudos futuros, para além do grupo com e sem RD e com e sem EMD, haja comparação com indivíduos saudáveis.

A PON2, à semelhança da PON1, possui actividade antioxidante, reduz o *stress* oxidativo intracelular e impede a oxidação mediada pelos LDL⁹⁰. Contrariamente à PON1 e PON3, a PON2 não está presente em fracções de lipoproteínas no soro, sendo uma proteína intracelular encontrada em quase todos os

tecidos, em particular na região peri-nuclear, retículo endoplasmático e mitocôndrias¹⁷⁷. Nisto se fundamenta a razão pela qual não foi analisada a actividade da PON2 na nossa amostra populacional.

CONCLUSÃO

Resumindo, no presente estudo foi possível estabelecer a associação entre os polimorfismos da PON1 e PON2, com a DM2. Sendo o alelo 192Q e o alelo 310S factores de risco para a DM2. Porém para ambos os polimorfismos não foi observado qualquer associação com o RD e o EMD. No entanto, para que esses resultados sejam fidedignos serão necessárias novas investigações. A RD é uma das mais graves complicações microvasculares da DM, sendo a principal responsável por novos casos de cegueira entre os indivíduos adultos activos. Ao longo dos últimos anos tem-se vindo a verificar um acentuado aumento na sua incidência e prevalência, acompanhando o aumento da ocorrência da DM2. A prevenção ou o atraso do desenvolvimento da RD assenta essencialmente no intenso controlo glicémico, da pressão arterial e dos níveis de triglicéridos. No entanto, estes factores parecem não ser suficientes, pois uma grande parte dos indivíduos, após alguns anos de diagnóstico de DM2, apresenta a visão comprometida pela RD. Neste contexto, é lícito colocar a hipótese de que o aparecimento da doença é modificado por factores ambientais interagindo com uma susceptibilidade genética, ditando assim se a doença se irá desenvolver precoce ou tardiamente, e possivelmente influenciando a sua progressão e o seu prognóstico. Inúmeras linhas de investigação apontam para uma influência genética na susceptibilidade para a RD. O nosso estudo, que incluiu diabéticos com e sem RD e EMD, e não diabéticos, sugere uma influência genética no desenvolvimento da DM2, RD e EMD. O alelo A do polimorfismo RAGE -374T/A parece conferir proteção para o desenvolvimento da RD e do EMD em indivíduos diabéticos tipo 2, enquanto que os indivíduos portadores do alelo Q do polimorfismo PON1 Gln192Arg ou do alelo S do polimorfismo PON2 Cys310Ser podem ter maior risco de desenvolvimento de DM2. Por outro lado, o polimorfismo do VEGF não surgiu associado à DM2, RD ou EMD na

população estudada. Também não se verificaram diferenças na actividade enzimática da PON1 nem entre os diferentes genótipos nem entre os indivíduos com e sem RD ou com e sem EMD.

É importante realçar que este se tratou de um estudo isolado, numa amostra populacional oriunda de uma única zona geográfica de Portugal, sendo assim necessária a realização de novos estudos que avaliem estes polimorfismos numa amostra populacional mais extensa. Ainda de salientar o facto de que, embora alguns polimorfismos estejam já identificados como possivelmente associados à RD, a falta de relação causal entre estes e a fisiopatologia da doença torna clara a necessidade de compreender como a genética influencia a patogénese da RD, não só para esclarecer os mecanismos envolvidos, como também para abrir caminho para a identificação de novos alvos de prevenção, terapêutica e prognóstico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o Mestrado, surgiu a grata oportunidade de participar num projecto de educação nutricional com crianças do 1º ciclo do ensino básico, em colaboração com a Escola EB1 de Alcabideche. O projecto visou avaliar a eficácia de estratégias de educação nutricional na faixa etária referida, em forma de aulas e actividade lúdicas, que despertassem o interesse das crianças para temas de relevância à saúde das mesmas, as quais podem surtir efeito no hábitos e estilos de vida futuros. A descrição do projecto encontra-se em anexo a esta dissertação.

Referências

1. Ihnat MA, Thorpe JE, Ceriello A. Hypothesis: the 'metabolic memory', the new challenge of diabetes. *Diabet Med.* 2007;24:582-586.
2. Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9:315-327.
3. Turnbull F, Neal B, Algert C, Chalmers J, Chapman N, Cutler J, Woodward M, MacMahon S. Effects of different blood pressure-lowering regimens on major cardiovascular events in individuals with and without diabetes mellitus: results of prospectively designed overviews of randomized trials. *Arch Intern Med.* 2005;165:1410-1419.
4. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27:1047-1053.
5. Correia G. Resultados do estudo da prevalência da diabetes em Portugal (PREVADIAB – 2009). *Anamnesis.* 2009;18:11-26.
6. Freeman JS. The increasing epidemiology of diabetes and review of current treatment algorithms. *J Am Osteopath Assoc.* 2010;110:eS2-eS6.
7. Meigs JB. Epidemiology of the metabolic syndrome, 2002. *Am J Manag Care.* 2002;8:S283-S292.
8. Li J, Wang JJ, Yu Q, Chen K, Mahadev K, Zhang SX. Inhibition of Reactive Oxygen Species by Lovastatin Downregulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Ameliorates Blood-Retinal Barrier Breakdown in db/db Mice: Role of NADPH Oxidase 4. *Diabetes.* 2010;59:1528-1538.

9. Cusi K. The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2010;10:306-315.
10. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med.* 2001;345:790-797.
11. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med.* 2001;344:1343-1350.
12. Permutt MA, Wasson J, Cox N. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115:1431-1439.
13. Hanis CL, Hallman D. Genetics of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep.* 2006;6:155-161.
14. Uthra S, Raman R, Mukesh B, Kumari R, Sharma T, Kumaramanickavel G. Genetics of Diabetic Retinopathy. *Int J Hum Genet.* 2008;8:155-159.
15. Liew G, Klein R, Wong TY. The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin.* 2009;49:35-52.
16. Heng BH, Sun Y, Cheah JT, Jong M. The Singapore National Healthcare Group Diabetes Registry--descriptive epidemiology of type 2 diabetes mellitus. *Ann Acad Med Singapore.* 2010;39:348-352.
17. Giugliano D, Standl E, Vilsboll T, Betteridge J, Bonadonna R, Campbell IW, Schernthaner GH, Staels B, Trichopoulos A, Farinero E. Is the current therapeutic armamentarium in diabetes enough to control the epidemic and its consequences? What are the current shortcomings? *Acta Diabetol.* 2009;46:173-181.

18. Greenstein A, Tavakoli M, Mojaddidi M, Al Sunni A, Matfin G, Malik RA. Microvascular complications: evaluation and monitoring relevance to clinical practice, clinical trials, and drug development. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*. 2007;7:166-171.
19. Lorenzi M, Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia*. 2001;44:791-804.
20. Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE. A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2009;58:2137-2147.
21. Yang H, Huang Y, Chen X, Liu J, Lu Y, Bu L, Xia L, Xiao W, Chen M, Nie Q, Liu Z. The role of CTGF in the diabetic rat retina and its relationship with VEGF and TGF-beta(2) , elucidated by treatment with CTGFsiRNA. *Acta Ophthalmol*. 2010;88:652-659.
22. Li H, Louey JW, Choy KW, Liu DT, Chan WM, Chan YM, Fung NS, Fan BJ, Baum L, Chan JC, Lam DS, Pang CP. EDN1 Lys198Asn is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Mol Vis*. 2008;14:1698-1704.
23. International Council of Ophthalmology. International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale. <http://www.icoph.org/standards/pdrdetail.html>. 2002.
Ref Type: Electronic Citation.
24. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-820.
25. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kitano S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247:21-26.
26. Cai J, Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye (Lond)*. 2002;16:242-260.

27. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL, III, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2003;26 Suppl 1:S99-S102.:S99-S102.
28. Nogueira V, Mouro P, Vila-Franca M, Mesquita M, Caldeira-Rosa P, Gallego R, Castanheira-Dinis A. Retinopatia diabética – o papel da Medicina Geral e Familiar. *Rev Port Clin Geral*. 2007;23:595-603.
29. Hietala K, Forsblom C, Summanen P, Groop PH. Heritability of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2008;57:2176-2180.
30. Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, Hernandez C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2006;2:71-98.
31. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, Turner RC, Holman RR, Manley SE, Matthews DR. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia*. 2001;44:156-163.
32. Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, Danis RP, Gangaputra S, Greven CM, Hubbard L, Esser BA, Lovato JF, Perdue LH, Goff DC, Jr., Cushman WC, Ginsberg HN, Elam MB, Genuth S, Gerstein HC, Schubart U, Fine LJ. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010;363:233-244.
33. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol*. 1984;102:520-526.
34. Zorena K, Mysliwska J, Mysliwiec M, Rybarczyk-Kapturska K, Malinowska E, Wisniewski P, Raczynska K. Association between vascular endothelial growth factor and hypertension in children and adolescents type I diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*. 2010;24:755-762.
35. Gupta A, Gupta V, Thapar S, Bhansali A. Lipid-lowering drug atorvastatin as an adjunct in the management of diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol*. 2004;137:675-682.

36. Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El Remessy AE, Al Shabrawey M, Platt DH, Caldwell RW. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003;19:442-455.
37. Ng DP. Human genetics of diabetic retinopathy: current perspectives. *J Ophthalmol.* 2010;2010. pii: 172593. Epub 2010 Jul 13.:172593.
38. Williams R, Airey M, Baxter H, Forrester J, Kennedy-Martin T, Girach A. Epidemiology of diabetic retinopathy and macular oedema: a systematic review. *Eye (Lond).* 2004;18:963-983.
39. Gerhardinger C, Dagher Z, Sebastiani P, Park YS, Lorenzi M. The transforming growth factor-beta pathway is a common target of drugs that prevent experimental diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2009;58:1659-1667.
40. Weisbrod D, Schwartz C. A review of diabetic retinopathy. *Ophthalmology Rounds.* 2009;7.
41. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet.* 2010;376:124-136.
42. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, Kester M, Kimball SR, Krady JK, LaNoue KF, Norbury CC, Quinn PG, Sandirasegarane L, Simpson IA. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes.* 2006;55:2401-2411.
43. Gleissner CA, Sanders JM, Nadler J, Ley K. Upregulation of aldose reductase during foam cell formation as possible link among diabetes, hyperlipidemia, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1137-1143.
44. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res.* 2007;2007:61038.:61038.
45. Reddy GB, Satyanarayana A, Balakrishna N, Ayyagari R, Padma M, Viswanath K, Petrash JM. Erythrocyte aldose reductase activity and sorbitol levels in diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2008;14:593-601.:593-601.

46. Ohmura C, Watada H, Azuma K, Shimizu T, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Fujitani Y, Hirose T, Tanaka Y, Kawamori R. Aldose reductase inhibitor, epalrestat, reduces lipid hydroperoxides in type 2 diabetes. *Endocr J.* 2009;56:149-156.
47. D'Souza DR, Salib MM, Bennett J, Mochin-Peters M, Asrani K, Goldblum SE, Renoud KJ, Shapiro P, Passaniti A. Hyperglycemia regulates RUNX2 activation and cellular wound healing through the aldose reductase polyol pathway. *J Biol Chem.* 2009;284:17947-17955.
48. Ramana KV, Friedrich B, Tammali R, West MB, Bhatnagar A, Srivastava SK. Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes.* 2005;54:818-829.
49. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol.* 1995;113:1538-1544.
50. Lu W, Feng B. The -374A allele of the RAGE gene as a potential protective factor for vascular complications in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Tohoku J Exp Med.* 2010;220:291-297.
51. Al Mesallamy HO, Hammad LN, El Mamoun TA, Khalil BM. Role of advanced glycation end product receptors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications.* 2011;25:168-174.
52. Takeuchi M, Takino J, Yamagishi S. Involvement of TAGE-RAGE System in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *J Ophthalmol.* 2010;2010:170393. Epub; 2010 Jun 22.:170393.
53. Tuttle KR, Johnson EC, Cooney SK, Anderberg RJ, Johnson EK, Clifton GD, Meek RL. Amino acids injure mesangial cells by advanced glycation end products, oxidative stress, and protein kinase C. *Kidney Int.* 2005;67:953-968.
54. Sourris KC, Forbes JM. Interactions between advanced glycation end-products (AGE) and their receptors in the development and progression of diabetic nephropathy - are these receptors valid therapeutic targets. *Curr Drug Targets.* 2009;10:42-50.

55. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2001;50:1505-1511.
56. Stitt AW. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol*. 2003;75:95-108.
57. Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol*. 2008;30:65-84.
58. Adamis AP. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br J Ophthalmol*. 2002;86:363-365.
59. Kollias AN, Ulbig MW. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107:75-83.
60. Esteves J, da Rosa CM, Kramer CK, Osowski LE, Milano S, Canani LH. Absence of diabetic retinopathy in a patient who has had diabetes mellitus for 69 years, and inadequate glycemic control: case presentation. *Diabetol Metab Syndr*. 2009;1:13.
61. Warpeha KM, Chakravarthy U. Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*. 2003;17:305-311.
62. Kangas-Kontio T, Vavuli S, Kakko SJ, Penna J, Savolainen ER, Savolainen MJ, Liinamaa MJ. Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:1401-1406.
63. Wong TY, Klein R, Islam FM, Cotch MF, Folsom AR, Klein BE, Sharrett AR, Shea S. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States. *Am J Ophthalmol*. 2006;141:446-455.
64. Arar NH, Freedman BI, Adler SG, Iyengar SK, Chew EY, Davis MD, Satko SG, Bowden DW, Duggirala R, Elston RC, Guo X, Hanson RL, Igo RP, Jr., Ipp E, Kimmel PL, Knowler WC, Molineros J, Nelson RG, Pahl MV, Quade SR, Rasooly RS, Rotter JI, Saad MF, Scavini M,

- Schelling JR, Sedor JR, Shah VO, Zager PG, Abboud HE. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: the FIND-Eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:3839-3845.
65. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P, Sundaresan P. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2006;12:336-41.:336-341.
66. Nicholson BP, Schachat AP. A review of clinical trials of anti-VEGF agents for diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010;248:915-930.
67. Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Exp Mol Pathol*. 2009;87:234-238.
68. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25:581-611.
69. Szaflik JP, Wysocki T, Kowalski M, Majsterek I, Borucka AI, Blasiak J, Szaflik J. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246:39-43.
70. Poulaki V, Joussen AM, Mitsiades N, Mitsiades CS, Iliaki EF, Adamis AP. Insulin-like growth factor-I plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy. *Am J Pathol*. 2004;165:457-469.
71. Ray D, Mishra M, Ralph S, Read I, Davies R, Brenchley P. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes*. 2004;53:861-864.
72. Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M, Osredkar J, Hawlina M, Peterlin B, Petrovic D. Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2008;14:1382-7.:1382-1387.

73. Al Kateb H, Mirea L, Xie X, Sun L, Liu M, Chen H, Bull SB, Boright AP, Paterson AD. Multiple variants in vascular endothelial growth factor (VEGFA) are risk factors for time to severe retinopathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC genetics study. *Diabetes*. 2007;56:2161-2168.
74. Kim HW, Ko GJ, Kang YS, Lee MH, Song HK, Kim HK, Cha DR. Role of the VEGF 936 C/T polymorphism in diabetic microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Nephrology (Carlton)*. 2009;14:681-688.
75. Amadio M, Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Govoni S, Pascale A. The PKC β /HuR/VEGF pathway in diabetic retinopathy. *Biochem Pharmacol*. 2010;80:1230-1237.
76. Zhao T, Zhao J. Association between the -634C/G polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;90:45-53.
77. Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Inukai K, Inoue I, Kawasaki I, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333:679-685.
78. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83:876-886.
79. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;84:489-497.

80. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J Pharmacol Sci.* 2005;97:305-311.
81. Lindholm E, Bakhtadze E, Cilio C, Agardh E, Groop L, Agardh CD. Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications. *PLoS One.* 2008;3:e2546.
82. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci (Lond).* 2009;116:621-637.
83. Yoshioka K, Yoshida T, Takakura Y, Umekawa T, Kogure A, Toda H, Yoshikawa T. Relation between polymorphisms G1704T and G82S of rage gene and diabetic retinopathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Intern Med.* 2005;44:417-421.
84. Ramprasad S, Radha V, Mathias RA, Majumder PP, Rao MR, Rema M. Rage gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy in a clinic-based population from South India. *Eye (Lond).* 2007;21:395-401.
85. Kumaramanickavel G, Ramprasad VL, Sripriya S, Upadyay NK, Paul PG, Sharma T. Association of Gly82Ser polymorphism in the RAGE gene with diabetic retinopathy in type II diabetic Asian Indian patients. *J Diabetes Complications.* 2002;16:391-394.
86. JiXiong X, BiLin X, MingGong Y, ShuQin L. -429T/C and -374T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26:2696-2697.
87. Ticozzi N, LeClerc AL, Keagle PJ, Glass JD, Wills AM, van Blitterswijk M, Bosco DA, Rodriguez-Leyva I, Gellera C, Ratti A, Taroni F, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Silani V, Furlong CE, Brown RH, Jr., Landers JE. Paraoxonase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2010;68:102-107.

88. Shin BS. Paraoxonase gene polymorphism in south-western Korean population. *J Korean Med Sci.* 2009;24:561-566.
89. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene.* 1998;213:149-157.
90. Ginsberg G, Neafsey P, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, Sonawane B. Genetic polymorphism in paraoxonase 1 (PON1): Population distribution of PON1 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2009;12:473-507.
91. Wang NN, Yuan L, Dai H, Han ZK, Zhao M. Effect of PON1 on dichlorvos toxicokinetics. *Emerg Med J.* 2011;28:313-315.
92. Marsillach J, Aragonés G, Mackness B, Mackness M, Rull A, Beltran-Debon R, Pedro-Botet J, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J. Decreased paraoxonase-1 activity is associated with alterations of high-density lipoprotein particles in chronic liver impairment. *Lipids Health Dis.* 2010;9:46:46.
93. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (Lond).* 2000;98:355-363.
94. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva VR, Morvardi S, Clarke CF, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:341-351.
95. Ng CJ, Bourquard N, Grijalva V, Hama S, Shih DM, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem.* 2006;281:29491-29500.

96. Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian J Med Res.* 2009;130:361-368.
97. Lu H, Zhu J, Zang Y, Ze Y, Qin J. Cloning, purification, and refolding of human paraoxonase-3 expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Protein Expr Purif.* 2006;46:92-99.
98. Kao YL, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M. A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2589-2592.
99. Hashemi M, Kordi-Tamandani DM, Sharifi N, Moazeni-Roodi A, Kaykhaei MA, Narouie B, Torkmanzahi A. Serum paraoxonase and arylesterase activities in metabolic syndrome in Zahedan, southeast Iran. *Eur J Endocrinol.* 2011;164:219-222.
100. Lakshmy R, Ahmad D, Abraham RA, Sharma M, Vemparala K, Das S, Reddy KS, Prabhakaran D. Paraoxonase gene Q192R & L55M polymorphisms in Indians with acute myocardial infarction & association with oxidized low density lipoprotein. *Indian J Med Res.* 2010;131:522-9.:522-529.
101. Birjmohun RS, Vergeer M, Stroes ES, Sandhu MS, Ricketts SL, Tanck MW, Wareham NJ, Jukema JW, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Both paraoxonase-1 genotype and activity do not predict the risk of future coronary artery disease; the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *PLoS One.* 2009;4:e6809.
102. Mukamal KJ, Pai JK, Jensen MK, Rimm EB. Paraoxonase 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction in women and men. *Circ J.* 2009;73:1302-1307.
103. Mendonca MI, Dos Reis RP, Freitas AI, Pereira A, Sousa AC, Freitas S, Ornelas I, Freitas C, Brehm A, Araujo JJ. Interaction of paraoxonase-192 polymorphism with low HDL-cholesterol in coronary artery disease risk. *Rev Port Cardiol.* 2010;29:571-580.
104. Mendonca MI, Dos Reis RP, Freitas AI, Sousa AC, Pereira A, Faria P, Gomes S, Silva B, Santos N, Serrao M, Ornelas I, Freitas S, Araujo JJ, Brehm A, Cardoso AA. Human

- paraoxonase gene polymorphisms and coronary artery disease risk. *Rev Port Cardiol.* 2008;27:1539-1555.
105. Vaisi-Raygani A, Ghaneialvar H, Rahimi Z, Tavalani H, Pourmotabbed T, Shakiba E, Vaisi-Raygani A, Kiani A, Aminian M, Alibakhshi R, Bartels C. Paraoxonase Arg 192 allele is an independent risk factor for three-vessel stenosis of coronary artery disease. *Mol Biol Rep.* 2011.
 106. Abdin AA, Hassanien MA, Ibrahim EA, El Noeman S. Modulating effect of atorvastatin on paraoxonase 1 activity in type 2 diabetic Egyptian patients with or without nephropathy. *J Diabetes Complications.* 2010;24:325-333.
 107. Marchegiani F, Spazzafumo L, Provinciali M, Cardelli M, Olivieri F, Franceschi C, Lattanzio F, Antonicelli R. Paraoxonase2 C311S polymorphism and low levels of HDL contribute to a higher mortality risk after acute myocardial infarction in elderly patients. *Mol Genet Metab.* 2009;98:314-318.
 108. Ichikawa K, Konta T, Emi M, Toriyama S, Takasaki S, Ikeda A, Shibata Y, Takabatake N, Takeishi Y, Kato T, Kawata S, Kubota I. Genetic polymorphisms of paraoxonase-1 are associated with chronic kidney disease in Japanese women. *Kidney Int.* 2009;76:183-189.
 109. Jalilian A, Javadi E, Akrami M, Fakhrzadeh H, Heshmat R, Rahmani M, Bandarian F. Association of cys 311 ser polymorphism of paraoxonase-2 gene with the risk of coronary artery disease. *Arch Iran Med.* 2008;11:544-549.
 110. Irace C, Cortese C, Fiaschi E, Scavelli F, Liberatoscioli L, Federici G, Gnasso A. The influence of PON1 192 polymorphism on endothelial function in diabetic subjects with or without hypertension. *Hypertens Res.* 2008;31:507-513.
 111. Karim R, Tang B. Use of antivasular endothelial growth factor for diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol.* 2010;4:493-517.:493-517.

112. Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*. 2011 Jan;214(1):20-36.
113. Dobronravov VA, Smirnov AV, Dragunov SV, Zver'kov RV, Evdokimova TV, Butrimova SSh, Grigorshchuk VI. Epidemiology of chronic renal disease in the North-West of Russia: setting-up the register. *Ter Arkh*. 2004;76(9):57-62.
114. Coelho C, Eixo renina-angiotensina: polimorfismos genéticos e interações fenotípicas. PhD thesis. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2004.
115. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 15 (1995), pp. 1812–1818.
116. Furlong CE, Richter RJ, Seidel SJ, Motulsky A. Role of genetics polymorphism of human plasma paraoxonase / arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxone. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 230-8.
117. Rajković MG, Rumora L, Juretić D, Grubisić TZ, Flegar-Mestrić Z, Vrkić N, Sinjeri Z, Barisić K. Effect of non-genetic factors on paraoxonase 1 activity in patients undergoing hemodialysis. *Clin Biochem*. 2010 Dec;43(18):1375-80.
118. Searle A, Gómez-Rosso L, Meroño T, Salomon C, Durán-Sandoval D, Giunta G, Grant C, Calvo C, Lamperti L, Brites F, Aguayo C. High LDL levels are associated with increased lipoprotein-associated phospholipase A(2) activity on nitric oxide synthesis and reactive oxygen species formation in human endothelial cells. *Clin Biochem*. 2011 Feb;44(2-3):171-7.

119. Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, Vandeberg JL, Almasy L, Blangero J, Maccluer JW, Mahaney MC. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity (Edinb)*. 2009 Feb;102(2):147-54.
120. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002.
121. Quintas A, Freire AP, Halpern MJ. *Bioquímica: organização molecular da vida*. Lisboa: Lidel, 2008.
122. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Muñoz B, Friedman DS, Kempen J, Taylor HR, Mitchell P; Eye Diseases Prevalence Research Group. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004 Apr;122(4):477-85.
123. World Health Organization. Causes of blindness and visual impairment. Available from <http://who.int/blindness/causes/en/index.html>.
124. Bunce C, Wormald R. Leading cause of certification for blindness and partial sight in England and Wales. *BMC Public Health*, 2006; 49:2234-2246.
125. Hayward LM, Burden ML, Burden AC, Blackledge H, Raymond NT, Botha JL, Karwatowski WSS, Duke T, Chang YF. What is the prevalence of visual impairment in the general and diabetic populations: are there ethnic and sex differences? *Diabet Med*, 2002; 19:27-34.
126. Sivaprasad S, Gupta B, Gulliford MC, Dodhia H, Mann S, Nagi D, Evans J. Ethnic Variation in the Prevalence of Visual Impairment in People Attending Diabetic Retinopathy Screening in the United Kingdom (DRIVE UK). *PLoS One*. 2012;7(6):e39608. Epub 2012 Jun 27.
127. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, Chen SJ, Dekker JM, Fletcher A, Grauslund J, Haffner S, Hamman RF, Ikram MK, Kayama T, Klein BE, Klein R, Krishnaiah S, Mayurasakorn K, O'Hare JP, Orchard TJ, Porta M, Rema M, Roy MS, Sharma T, Shaw J, Taylor H, Tielsch JM, Varma R, Wang JJ, Wang N, West S, Xu L, Yasuda M, Zhang X, Mitchell P, Wong TY; Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. Global

- prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012 Mar;35(3):556-64.
128. Zhang X, Saaddine JB, Chou CF, Cotch MF, Cheng YJ, Geiss LS, Gregg EW, Albright AL, Klein BE, Klein R. Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008. *JAMA*. 2010 Aug 11;304(6):649-56.
129. Khoner EM, Aldington SJ, Stratton IM, Manley SE, Holman RR, Matthews DR, Turner RC. United Kingdom Prospective Diabetes Study, 30: diabetic retinopathy at diagnosis of non-insulin-dependent diabetes mellitus and associated risk factors. *Arch Ophthalmol*. 1998 Mar;116(3):297-303.
130. Nguyen HT, Luzio SD, Dolben J, West J, Beck L, Coates PA, Owens DR. Dominant risk factors for retinopathy at clinical diagnosis in patients with type II diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 1996 Jul-Aug;10(4):211-9.
131. van Leiden HA, Dekker JM, Moll AC, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD, Polak BC. Blood pressure, lipids, and obesity are associated with retinopathy: the hoorn study. *Diabetes Care*. 2002 Aug;25(8):1320-5.
132. Plutzky J. Macrovascular effects and safety issues of therapies for type 2 Diabetes. *Am J Cardiol*. 2011 Aug 2;108(3 Suppl):25B-32B.
133. Tapp RJ, Shaw JE, Harper CA, de Courten MP, Balkau B, McCarty DJ, Taylor HR, Welborn TA, Zimmet PZ; AusDiab Study Group. The prevalence of and factors associated with diabetic retinopathy in the Australian population. *Diabetes Care*. 2003 Jun;26(6):1731-7.
134. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*. 2012 Mar;366(13):1227-39.
135. Brown JB, Pedula KL, Summers KH. Diabetic retinopathy: contemporary prevalence in a well-controlled population. *Diabetes Care*. 2003 Sep;26(9):2637-42.

136. Ding J, Wong TY. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Curr Diab Rep*. 2012 Aug;12(4):346-54.
137. Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA*. 2007 Aug 22;298(8):902-16.
138. Gallego PH, Craig ME, Hing S, Donaghue KC. Role of blood pressure in development of early retinopathy in adolescents with type 1 diabetes: prospective cohort study. *BMJ*. 2008 Aug 26;337:a918.
139. Towfighi A, Saver JL, Engelhardt R, Ovbiagele B. A midlife stroke surge among women in the United States. *Neurology*. 2007 Nov 13;69(20):1898-904.
140. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *Lancet*. 2011 Jul 2; 378(9785):31-40.
141. World Health Organization. Obesity. Preventing and Managing the global epidemic, Geneva, 2002.
142. Grundy SM. Cholesterol management in high-risk patients without heart disease. When is lipid-lowering medication warranted for primary prevention? *Postgrad Med*. 1998 Nov;104(5):117-20, 123-4, 129.
143. Rodbard HW, Bays HE, Gavin JR 3rd, Green AJ, Bazata DD, Lewis SJ, Fox KM, Reed ML, Grandy S. Rate and risk predictors for development of self-reported type-2 diabetes mellitus over a 5-year period: the SHIELD study. *Int J Clin Pract*. 2012 Jul;66(7):684-691.

144. Harris MI, Eastman RC, Cowie CC, Flegal KM, Eberhardt MS. Racial and ethnic differences in glycemic control of adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1999 Mar;22(3):403-8.
145. Sivaprasad S, Gupta B, Crosby-Nwaobi R, Evans J. Prevalence of diabetic retinopathy in various ethnic groups: a worldwide perspective. *Surv Ophthalmol*. 2012 Jul;57(4):347-70.
146. Hallman DM, Huber JC Jr, Gonzalez VH, Klein BE, Klein R, Hanis CL. Familial aggregation of severity of diabetic retinopathy in Mexican Americans from Starr County, Texas. *Diabetes Care*. 2005 May;28(5):1163-8,
147. Yang Y, Andresen BT, Yang K, Zhang Y, Li X, Li X, Wang H. Association of vascular endothelial growth factor -634C/G polymorphism and diabetic retinopathy in type 2 diabetic Han Chinese. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010 Oct;235(10):1204-11. Epub 2010 Aug 26.
148. Zhao T, Zhao J. Association between the -634C/G polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Oct;90(1):45-53.
149. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P, Sundaresan P. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2006 Apr 11;12:336-41.
150. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 May;51(5):1635-9.
151. Errera FI, Canani LH, Silva ME, Yeh E, Takahashi W, Santos KG, Souto KE, Tschiedel B, Roisenberg I, Gross JL, Passos-Bueno MR. Functional vascular endothelial growth factor - 634G>C SNP is associated with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study in a Brazilian population of European ancestry. *Diabetes Care*. 2007 Feb;30(2):275-9.

152. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Apr;116(8):621-37.
153. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Achneider D, Witte S, Linn T. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 2003; 198:1507-15.
154. Kancova K, Benes P, Kuchrickova S. Functional analysis of the common haplotype in the receptor for advanced glycation end-products gene previously identified as a susceptibility factor for diabetic nephropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2010; 118:93-95.
155. Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2011 Aug;11(4):244-52.
156. Sakurai S, Yamamoto Y, Tamei H, Matsuki H, Obata K, Hui L, Miura J, Osawa M, Uchigata Y, Iwamoto Y, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto. Development of ELISA for esRAGE and its application to type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006 Aug;73(2):158-65.
157. Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Exp Gerontol*. 2011 Apr;46(4):217-24.
158. Kang P, Tian C, Jia C. Association of RAGE gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic nephropathy. *Gene*, 2012 May 25;500(1):1-9.
159. Kanková K, Márová I, Záhejský J, Muzík J, Stejskalová A, Znojil V, Vácha J. Polymorphisms 1704G/T and 2184A/G in the RAGE gene are associated with antioxidant status. *Metabolism*. 2001 Oct;50(10):1152-60.
160. Falcone C, Campo I, Emanuele E, Buzzzi MP, Geroldi D, Belvito C, Zorzetto M, Sbarsi I, Cuccia M. -374T/A polymorphism of the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2005 Apr;354(1-2):111-6.

161. dos Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Pires Souto KE, Roisenberg I. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes. *Mol Genet Metab.* 2005; 85:149-156.
162. Lindholm E, Bakhtadze E, Sjögren M, Cilio CM, Agardh E, Groop L, Agardh CD. The -374 T/A polymorphism in the gene encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetic patients. *Diabetologia.* 2006 Nov;49(11):2745-55. Epub 2006 Sep 13.
163. Ramprasad S, Radha V, Mathias RA, Majumder PP, Rao MR, Rema M. RAGE gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy in a clinic-based population from South India. *Eye (Lond).* 2007 Mar;21(3):395-401.
164. Zee RY, Romero JR, Gould JL, Ricupero DA, Ridker PM. Polymorphisms in the advanced glycosylation end product-specific receptor gene and risk of incident myocardial infarction or ischemic stroke. *Stroke.* 2006 Jul;37(7):1686-90.
165. Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Amort J, Clement AM, Pautz A, Li H, Förstermann U, Horke S. Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis.* 2011 Jan 13;2:e112.
166. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13:357-62.
167. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics.* 2001; 11:77-84.
168. Shin BS, Oh SY, Kim YS, Kim KW. The paraoxonase gene polymorphism in stroke patients and lipid profile. *Acta Neurol Scand* 2008; 117:237-43.

169. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arai K, Ito H, Kumon Y, Hashimoto K. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1998 May;47(5):598-602.
170. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Nov;20(11):2441-7.
171. Ruiz J, Banché H, James RW, Blatter Garin MC, Vaise C, Charpentier G. Gln Arg 192 polymorphisms in angiographically assessed coronary artery disease. *J Clin Invest*. 1995; 346:869-72.
172. Mackness B,
173. Lakshmy R, Ahmad D, Abraham RA, Sharma M, Vemparala K, Das S, Reddy KS, Prabhakaran D. Paraoxonase gene Q192R and L55M polymorphisms in Indians with acute myocardial infarction & association with oxidized low density lipoprotein. *Indian J Med Res*. 2010 Apr;131:522-9
174. Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, Watanabe G, Ishikawa K, Ikeda Y. A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Dec;17(12):3565-9.
175. Bayrak A, Bayrak T, Tokgözoğlu SL, Volkan-Salanci B, Deniz A, Yavuz B, Alikasifoglu M, Demirpençe E. Serum PON-1 activity but not Q192R polymorphism is related to the extent of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2012 Apr 26;19(4):376-84.
176. Abbott C, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in Diabetes Mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Nov;15(11):1812-8.

177. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):44444-9.

ANEXOS

Anexo 1

1. Avaliação oftalmológica da população de doentes do Hospital Fernando da Fonseca

Os resultados oftalmológicos dos diabéticos relativamente à RD e EMD são apresentados na Tabela 17. A espessura macular dos 47 indivíduos foi determinada a partir do OCT.

Tabela 17: Resultados oftalmológicos dos diabéticos de acordo com a presença ou ausência de RD ou EMD, e associação entre RD e EMD (média \pm desvio padrão).

	N	MAVC	PIO	OCT
Sem RD	20	0,84 \pm 0,23 ^{a/d}	14,6 \pm 4,1	235,20 \pm 49,84 ^{a/d}
Com RD	54	0,59 \pm 0,31 ^a	15,9 \pm 3,8	285,91 \pm 77,05 ^a
Sem EMD	36	0,81 \pm 0,20 ^b	14,1 \pm 3,9 ^b	251,17 \pm 65,39 ^b
Com EMD	38	0,55 \pm 0,33 ^b	16,5 \pm 3,6 ^b	292,13 \pm 76,88 ^b
RD sem EMD	18	0,81 \pm 0,11 ^{c/d}	13,3 \pm 2,7	268,44 \pm 75,55
RD com EMD	36	0,52 \pm 0,32 ^{c/d}	16,5 \pm 3,8	294,64 \pm 77,35 ^d

*MAVC – Melhor acuidade visual corrigida. §PIO – Pressão intra-ocular. †OCT – Tomografia ocular computadorizada. ^{a,b,c,p} < 0,05, t-test; ^{d,p} < 0,05 para RD com EMD comparado com os outros grupos assinalados, ANOVA seguido de post-hoc Sidak.

Os resultados da Tabela 17 mostram que os diabéticos sem RD e/ou sem EMD apresentam melhor MAVC do que os pacientes com uma ou ambas estas patologias, como seria de esperar, sendo os que apresentam pior MAVC os diabéticos com RD associado a EMD. Já a PIO apenas foi superior nos diabéticos com EMD quando comparados com os diabéticos sem EMD. Uma vez que o EMD é diagnosticado de acordo com a espessura macular verificou-se que esta foi superior nos pacientes com RD ou EMD quando comparados com os diabéticos sem estas patologias, sendo a diferença observada na comparação RD vs sem RD devida à presença concomitante de EMD nestes pacientes.

Analisou-se os tratamentos prévios aos quais os indivíduos foram submetidos para o tratamento da RD, sendo eles pan-fotocoagulação completa, pan-fotocoagulação incompleta, grelha macular, laser focal, injeção intravítrea de anti-VEGF e injeção intravítrea de triamcinolona. Verificou-se que existia uma maior percentagem de pacientes com RD e sem EMD a serem submetidos a pan-fotocoagulação completa prévia do que aqueles que apresentavam EMD (57,1% vs 42,9%, $p=0,032$). Avaliando a gravidade da RD e a realização da pan-fotocoagulação completa prévia notou-se uma tendência ($F=5,743$, $p=0,026$) para esta se tornar mais frequente à medida que aumenta a gravidade da RD. O laser focal, a injeção intravítrea de triamcinolona e a grelha macular foram realizados por todos os pacientes que apresentavam RD com EMD associado (100%). O facto de os doentes que realizaram grelha macular apresentarem menos EMD quando comparados com os que não a realizaram (35,7% vs 64,3%, $p=0,003$), justifica-se pelo facto de a grelha macular ser uma das formas de tratamento do EMD. A não observação desta diminuição significativa de EMD nos pacientes tratados com laser focal ou injeção intravítrea de triamcinolona poderá indicar uma maior eficácia da grelha macular enquanto tratamento para o EMD. As restantes abordagens terapêuticas não apresentaram qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos com RD sem ou com EMD ou EMD isoladamente.

Anexo 2

Eficácia das estratégias de intervenção para a Nutrição, Alimentação e Exercício Físico no 1º Ciclo

Fernanda Azancoth¹, Isabel Assis², Otilia Cruz², Constança Coelho¹

¹Laboratório de Genética, Centro de cardiologia, Faculdade de Medicina de Lisboa; ²Escola EB1 nº 1 de Alcabideche

Introdução: É consensual que a obesidade é um dos maiores flagelos do sec. XXI, e que a cada dia afecta um maior número de indivíduos, assim como é de conhecimento geral de que o seu aparecimento surge cada vez com maior incidência na população infantil. Estima-se que o número de crianças com sobrepeso e obesidade aumentará para cerca de 60 milhões em 2020¹, pelo que a obesidade infantil é actualmente considerada um grave problema de saúde pública². Alterações metabólicas associadas à obesidade, como a dislipidémia, a hipertensão arterial, a hiperglicemia e a resistência à insulina, nomeados como factores de risco para a diabetes tipo 2 e as doenças cardiovasculares, antes vistos somente em indivíduos adultos, hoje são cada vez mais frequentes em idades mais jovens³. A magnitude do problema tem levantado várias questões em inúmeras vertentes académicas, principalmente pela grande dificuldade que enfrentam os profissionais de saúde e não só, na procura de uma solução eficaz⁴. Sabe-se que a solução do problema passa pela prevenção e pela eficácia da mesma. Etiologicamente, a obesidade é considerada uma doença multifactorial, com causas hereditárias e ambientais. No entanto, os factores ambientais apresentam maior influência na

expressão da doença, nomeadamente os hábitos alimentares e a prática de actividade física⁵. Apesar da existência de programas de educação, nas escolas, que fazem a ligação entre a alimentação e a saúde, são necessárias novas abordagens para complementar os programas disponíveis e fornecer mecanismos eficazes que sensibilizem os alunos, mudando os seus hábitos fora do ambiente escolar. Tal poderá passar por alterações a nível das estratégias de ensino, em que, englobados nas aulas de ciências, existam maiores conteúdos relacionados com saúde e nutrição⁶. A sensibilização das crianças para a importância da modificação de atitudes e comportamentos, ensinando-as desde cedo a adoptar hábitos alimentares e de exercício físico saudáveis, poderá ser a mais eficaz forma de prevenção para a ocorrência da obesidade e das patologias a esta associadas⁷. Por forma a maximizar a eficácia desta sensibilização, é fundamental o planeamento e elaboração de intervenções direccionadas especificamente para a faixa etária a sensibilizar, nomeadamente através de actividades lúdicas atractivas, que captem a atenção da criança. Levando isto em conta, o presente estudo teve como objectivo avaliar a eficácia de acções de sensibilização de crianças do 1º ciclo na aprendizagem de alguns conceitos relativos a alimentação e exercício físico.

Métodos: Estudo prospectivo, observacional, cuja amostra populacional foi constituída por alunos do 2º e 4º anos da Escola EB1 nº 1 de Alcabideche (Cascais). A faixa etária estudada compreendia crianças dos seis aos sete anos e dos nove aos dez anos, distribuídos em duas turmas de 22 e 23 alunos, respectivamente, totalizando 45 crianças. Desse total estudado, dois alunos não participaram do estudo, por não estarem presentes na primeira fase da intervenção.

Sendo um estudo que envolveu crianças, foram seguidas as recomendações da Declaração de Helsinquia. Todos os Encarregados de Educação assinaram um consentimento informado, a autorizar os seus educandos a participar no estudo. O protocolo de investigação e o consentimento informado foram previamente aprovados pelo Agrupamento de Escolas de Alcabideche.

Foram realizadas três acções de sensibilização, com intervalos de 2-3 meses entre si, que consistiram em apresentações interactivas, em formato de aula, e actividades lúdicas, especificamente desenhadas para a idade das crianças, abordando a nutrição, alimentação e exercício físico. Foram particularmente focados a importância de uma alimentação adequada e da prática de exercício físico para um crescimento e desenvolvimento saudável, abordando temas como a obesidade e a diabetes. Foi dada particular relevância a estimular o interesse das crianças em experimentar a maior variedade de alimentos possível e a praticar exercício físico com frequência. A cada intervenção, as crianças responderam a um questionário padronizado auto-administrado, de escolha múltipla, após leitura de todas as questões a toda a turma, para avaliar não só os seus conhecimentos prévios dos assuntos abordados como também a eficácia destas acções de sensibilização, ao longo do tempo. Os resultados foram analisados por ANCOVAs, para análise da variação ao longo do tempo, usando os valores basais como co-variáveis, e utilizando t-tests para comparação entre turmas na mesma intervenção. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados e discussão

O questionário aplicado revelou-se adequado para a faixa etária estudada, sendo compreensível para os alunos o seu conteúdo e tendo estes identificado correctamente as figuras neles constantes. O interesse e o entusiasmo por parte das crianças foi uma constante a cada intervenção, na disponibilidade em responderem ao questionário, participarem nas aulas e na execução das actividades propostas. Observou-se uma especial atenção para as palavras novas que iam conhecendo ao longo das intervenções e a curiosidade em saberem o seu significado. Os questionários aplicados continham dezanove questões, agrupadas por 5 temas: Comportamento Alimentar; Nutrientes (gerais e específicos); Actividade Física; Perguntas relacionadas com conhecimentos previamente adquiridos (Perguntas “Pre-Existing Knowledge – PEK”) e perguntas relacionadas com conhecimentos que apenas poderiam ser adquiridos devido às intervenções

(Perguntas não “PEK”). O questionário inicial, realizado antes das intervenções, revelou um maior número de respostas correctas entre os alunos do 4º ano, como seria de esperar pela maturidade académica, o que se manteve ao longo das duas intervenções seguintes. No entanto, a nível do 2º ano, observou-se que nos temas Comportamento Alimentar, Nutrientes Específicos e Perguntas não “PEK” houve aprendizagem estatisticamente significativa, da primeira para a última intervenção, superior à dos alunos do 4º ano. No entanto, verificou-se que em ambas as turmas houve um declínio nos conhecimentos adquiridos da segunda para a terceira intervenção.

Conclusões: A Escola assume um papel importante como promotora da saúde, sendo um local desejável e eficaz para aplicar medidas estratégicas que visem atenuar os vários problemas inerentes à má alimentação e à prática de hábitos de vida pouco saudáveis, nomeadamente no que diz respeito à actividade física e hábitos de sono. Tomar em consideração a forma como esses conhecimentos são transmitidos revela-se importante para a eficácia da intervenção. Actividades que possam captar o interesse e a atenção desta faixa etária constituem um dos pontos chave para o sucesso da intervenção, assim como a periodicidade com que esses conhecimentos são transmitidos se revela fulcral. Informar e formar as crianças para a prática de hábitos alimentares e de exercício físico saudáveis constitui uma das principais medidas para o combate à obesidade. É indispensável estudar medidas de intervenção eficazes que possam ser aplicadas a nível escolar.

Referências

- 1 de Onis M, Blössner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr.* 2010 Nov;92(5):1257-64.
- 2 Binkin N, Spinelli A, Baglio G, Lambertini A. What is common becomes normal: The effect of obesity prevalence on maternal perception. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011 Dec 31.

- 3 Marwaha RK, Tandon N, Singh Y, Aggarwal R, Grewal K, Mani K. A study of growth parameters and prevalence of overweight and obesity in school children from delhi. *Indian Pediatr.* 2006 Nov;43(11):943-52.
- 4 Daniels ZS, Nick TG, Liu C, Cassedy A, Glauser TA. Obesity is a common comorbidity for pediatric patients with untreated, newly diagnosed epilepsy. *Neurology.* 2009 Sep 1;73(9):658-64.
- 5 Saker M, Merzouk H, Merzouk SA, Ahmed SB, Narce M. Predictive Factors of Obesity and their Relationships to Dietary Intake in Schoolchildren in Western Algeria. *Maedica (Buchar).* 2011 Apr;6(2):90-9.
- 6 Gower JR, Moyer-Mileur LJ, Wilkinson RD, Slater H, Jordan KC Validity and reliability of a nutrition knowledge survey for assessment in elementary school children. *J Am Diet Assoc.* 2010 Mar;110(3):452-6.
- 7 DeVault N, Kennedy T, Hermann J, Mwavita M, Rask P, Jaworsky A. It's all about kids: preventing overweight in elementary school children in Tulsa, OK. *J Am Diet Assoc.* 2009 Apr;109(4):680-7.

Anexo 2.1 – Questionário 2º ano

Uma alimentação equilibrada é muito importante para crescermos com saúde. É importante termos bons hábitos alimentares. É dos alimentos que tiramos energia e são eles que nos ajudam a crescer, a cicatrizar ferimentos e a proteger-nos de doenças.

Pensando nisso, responde às questões que se seguem sobre a alimentação, o exercício físico e a saúde.

Dica: Assinala a opção que achares correcta marcando um X.



1. Sabemos que os alimentos são ricos em nutrientes que nos mantêm saudáveis e com energia. Os nutrientes são:
 - a) Hidratos de carbono, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais
 - b) Somente os hidratos de carbono e as proteínas
 - c) Todas as proteínas, as gorduras e os hidratos de carbono

2. É muito bom comer, por isso devemos fazer as refeições:
 - a) Com intervalos de 3 a 4 horas
 - b) Quando nos apetece, sem ter horários
 - c) Em grandes quantidades

3. “Devemos comer devagar e os alimentos devem ser bem mastigados.”
 - a) A frase está errada
 - b) A frase está correcta

4. Um pequeno-almoço saudável deve conter:
 - a) Bolachas e leite com chocolate
 - b) Bolos e sumos
 - c) Leite, pão e fruta

5. Nos lanches devo preferir:
- a) Um gelado
 - b) Um folhado de queijo e fiambre
 - c) Uma sandes
6. Sabemos que as frutas e verduras são importantes para termos uma alimentação equilibrada. Elas são ricas em:
- a) Proteínas e gorduras
 - b) Vitaminas e minerais
 - c) Hidratos de carbono e proteínas

7. As frutas devem ser comidas:
- a) Todos os dias
 - b) Uma vez por semana
 - c) Só no verão



8. As verduras de cor verde escuro, como o agrião e o espinafre, são ricas em que tipo de vitamina?
- a) A
 - b) B12
 - c) C
 - d) K
9. Podemos encontrar muitas vitaminas diferentes nos alimentos que ingerimos diariamente. As vitaminas encontradas, por exemplo, na cenoura e no tomate, são:
- a) Os betacarotenos
 - b) A vitamina C ou ácido ascórbico
 - c) A vitamina D
10. Quando estou com sede, a melhor bebida é:
- a) Água
 - b) Sumo
 - c) Leite
11. Não devemos abusar:
- a) Do sal e do açúcar
 - b) Da água
 - c) Das saladas

12. Sabemos que as gorduras em excesso são prejudiciais à nossa saúde, mas não nos podemos esquecer que devem fazer parte da nossa alimentação diária em doses certas. São importantes para a formação de substâncias importantes no organismo como:

- a) O colesterol
- b) A insulina
- c) A vitamina C



13. Uma alimentação saudável é:

- a) Não comer gorduras nem doces
- b) Apenas comer frutas e vegetais
- c) Comer de tudo um pouco

14. Comer de forma saudável dá-nos energia positiva e:

- a) Ficamos com electricidade a mais
- b) Ajuda-nos a aprender e a brincar
- c) Não conseguimos estar quietos nas aulas

15. Quando queremos obter energia o nosso corpo recorre primeiro a:

- a) Proteínas
- b) Hidratos de carbono
- c) Gorduras

16. Para ter uma actividade física regular:

- a) Basta mexer-me, brincar, andar a pé
- b) É preciso ter bastante dinheiro
- c) Devo sentar-me no sofá a ver televisão

17. Se não tiver uma alimentação saudável e praticar actividade física corro o risco de ficar:

- a) Sem dormir
- b) Com muita energia
- c) Doente



18. Uma doença relacionada com a má alimentação e com a falta de actividade física é a diabetes. A diabetes é:

- a) A presença de açúcar alto no sangue
- b) Provocada pela falta de cálcio
- c) A falta do ferro

19. O que é o ciclopentanoperhidrofenantreno?

- a) O precursor do colesterol, que é sempre mau
- b) O precursor da vitamina C
- d) O precursor do colesterol, que é fundamental para o nosso cérebro, ajudando a nossa aprendizagem e memória
- e) O precursor do cálcio

Anexo 2.2 – Questionário 4º ano

Uma alimentação equilibrada é muito importante para crescermos com saúde. É importante termos bons hábitos alimentares. É dos alimentos que tiramos energia e são eles que nos ajudam a crescer, a cicatrizar ferimentos e a proteger-nos de doenças.

Pensando nisso, responde às questões que se seguem sobre a alimentação, o exercício físico e a saúde.

Dica: Assinala a opção que achares correcta marcando um X.



1. Sabemos que os alimentos são ricos em nutrientes que nos mantêm saudáveis e com energia. Os nutrientes são:
 - a) Hidratos de carbono, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais
 - b) Somente os hidratos de carbono e as proteínas
 - c) Todas as proteínas, as gorduras e os hidratos de carbono

2. É muito bom comer, por isso devemos fazer as refeições:
 - a) Com intervalos de 3 a 4 horas
 - b) Quando nos apetece, sem ter horários
 - c) Em grandes quantidades

3. “Devemos comer devagar e os alimentos devem ser bem mastigados.”
 - a) A frase está errada
 - b) A frase está correcta

4. Um pequeno-almoço saudável deve conter:
 - a) Bolachas e leite com chocolate
 - b) Bolos e sumos
 - c) Leite, pão e fruta

5. Nos lanches devo preferir:
- a) Um gelado
 - b) Um folhado de queijo e fiambre
 - c) Uma sandes
6. Sabemos que as frutas e verduras são importantes para termos uma alimentação equilibrada. Elas são ricas em:
- a) Proteínas e gorduras
 - b) Vitaminas e minerais
 - c) Hidratos de carbono e proteínas

7. As frutas devem ser comidas:
- a) Todos os dias
 - b) Uma vez por semana
 - c) Só no verão



8. As verduras de cor verde escuro, como o agrião e o espinafre, são ricas em que tipo de vitamina?
- a) A
 - b) B12
 - c) C
 - d) K
9. Podemos encontrar muitas vitaminas diferentes nos alimentos que ingerimos diariamente. As vitaminas encontradas, por exemplo, na cenoura e no tomate, são:
- a) Os betacarotenos
 - b) A vitamina C ou ácido ascórbico
 - c) A vitamina D
10. Quando estou com sede, a melhor bebida é:
- a) Água
 - b) Sumo
 - c) Leite
11. Não devemos abusar:
- a) Do sal e do açúcar
 - b) Da água
 - c) Das saladas

12. Sabemos que as gorduras em excesso são prejudiciais à nossa saúde, mas não nos podemos esquecer que devem fazer parte da nossa alimentação diária em doses certas. São importantes para a formação de substâncias importantes no organismo como:

- a) O colesterol
- b) A insulina
- c) A vitamina C



13. Uma alimentação saudável é:

- a) Não comer gorduras nem doces
- b) Apenas comer frutas e vegetais
- c) Comer de tudo um pouco

14. Comer de forma saudável dá-nos energia positiva e:

- a) Ficamos com electricidade a mais
- b) Ajuda-nos a aprender e a brincar
- c) Não conseguimos estar quietos nas aulas

15. Quando queremos obter energia o nosso corpo recorre primeiro a:

- a) Proteínas
- b) Hidratos de carbono
- c) Gorduras

16. Para ter uma actividade física regular:

- a) Basta mexer-me, brincar, andar a pé
- b) É preciso ter bastante dinheiro
- c) Devo sentar-me no sofá a ver televisão

17. Se não tiver uma alimentação saudável e praticar actividade física corro o risco de ficar:

- a) Sem dormir
- b) Com muita energia
- c) Doente



18. Uma doença relacionada com a má alimentação e com a falta de actividade física é a diabetes. A diabetes é:

- a) A presença de açúcar alto no sangue
- b) Provocada pela falta de cálcio
- c) A falta do ferro

19. O que é o ciclopentanoperhidrofenantreno?

- a) O precursor do colesterol, que é sempre mau
- b) O precursor da vitamina C
- c) O precursor do colesterol, que é fundamental para o nosso cérebro, ajudando a nossa aprendizagem e memória
- d) O precursor do cálcio

Anexo 2.3 – Programação das 3 intervenções

CONTEÚDOS ABORDADOS

Alimentos

Nutrientes

1. Função dos Nutrientes
 - a) Proteínas (construtores)
 - b) Hidratos de carbono e Gorduras (energéticos)
 - c) Vitaminas e minerais (reguladores)
2. Alimentos fontes desses nutrientes.

Alimentação saudável e equilibrada

1. Roda dos alimentos
 - a) Os grupos
 - b) As porções recomendadas

Vitaminas e Minerais

1. Antioxidantes
 - a) Definição
 - b) Função

Água

Doenças causadas pela má alimentação.

1. Diabetes.
 - a) Definição.
 - b) Causas
 - c) Sintomas e tratamento.
 - d) Recomendações.

Dicas/ Recomendações/ Cuidados

Anexo 3

Artigo de Revisão